



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

고지방식으로 유도된 비만 마우스의 간 조직 DNA 메틸화 변화

**Genome-wide hepatic DNA methylation changes
in high fat diet-induced obese mice**

2016 년 8 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

윤 아 람

국 문 초 록

고지방식으로 유도된 비만 마우스의 간 조직 DNA 메틸화 변화

서울대학교 대학원 식품영양학과

윤 아 람

고지방식은 비만의 원인이 되며 비만은 심혈관질환과 암의 주요 위험요인이다. 반면에 열량제한식은 이러한 만성질환의 위험을 줄여줌으로써 수명 연장을 가능케 할 수 있다. 이렇듯 식이에 따라 건강이 증진되기도 하고 오히려 악화되기도 하는데, 그 기전을 밝히기 위해 DNA 메틸화로 대표되는 후성유전학이 주목 받고 있다. 본 연구에서는 전장 유전체 수준(genome-wide)의 간 DNA 메틸화 변화를 측정하고 DNA 메틸화 패턴 변화와 관련된 유전자 network 를 분석함으로써, 고지방식으로 인한 비만이 후성유전학적 변화에 미치는 영향을 연구하였다. 이를 위하여 7 주령의 C57BL/6 마우스를 세 군으로 나누는 뒤, 고지방식이(HFD, high-fat diet), 대조식이(CD, control diet),

열량제한대조식이(CRCD, calorie-restricted control diet)를 16 주 간 섭취시켰다. 실험 기간 동안 식이 섭취량과 체중을 주기적으로 측정하였고, 희생 후 간 무게를 측정하였다. 간 중성지방 및 콜레스테롤 농도는 비색적 효소적 분석법에 따라 측정하였다. 전장 유전체 수준의 DNA 메틸화 변화는 메틸화 DNA 면역침강법 및 DNA methylation microarray 방법으로 분석하였으며, 개별 유전자의 mRNA 발현 수준은 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 실험 결과, 고지방식으로 인한 비만은 지질 대사 및 간 지방증 관련 생물학적 network 와 관련된 유전자의 DNA 메틸화 변화를 유도하였다. CD 군과 비교하였을 때, HFD 군은 염증성 유전자인 *Casp1* 의 전사개시점으로부터 1.5 kb upstream 위치에 CpG region 이 저메틸화되었으며, mRNA 발현 수준은 높았다. 또한 CRCD 군과 비교하였을 때, HFD 군에서 에너지 대사에 관여하는 유전자인 *Ndufb9* 의 전사개시점으로부터 2.6 kb downstream 위치에 과메틸화된 CpG region 이 있었고, mRNA 발현 수준이 낮았다. 결론적으로, 고지방식은 지방 대사 및 간 지방증 관련 유전자의 DNA 메틸화 변화를 유도한다. 특히 고지방식이 섭취로 인한 *Casp1* 과 *Ndufb9* 의 메틸화 수준 변화는 유전자 발현 조절로 이어졌음을 확인할 수 있었다.

주요어: 고지방식이, DNA 메틸화, high-throughput 연구, 간, *Casp1*, *Ndufb9*

학 번: 2013-23422

목 차

국 문 초 록.....	i
목 차.....	iii
표 목 차.....	v
그 립 목 차.....	vi
약 어 목 록.....	vii
I. 서 론.....	- 1 -
II. 문 헌 고 찰.....	- 4 -
1. 후성유전학 개요.....	- 4 -
2. DNA 메틸화.....	- 7 -
2.1. DNA 메틸화와 유전자 발현 조절 기능.....	- 7 -
2.2. DNA 메틸화와 생애주기.....	- 11 -
3. 비만에 의한 간 조직에서의 변화.....	- 14 -
3.1. 비만과 간의 탄수화물 및 지질 대사 변화.....	- 14 -
3.2. 비만과 간 조직의 염증반응.....	- 16 -
4. 고지방 식이와 간 조직 DNA 메틸화 변화.....	- 17 -
III. 연 구 방 법.....	- 18 -
1. 실험 설계 및 실험 동물 사육.....	- 18 -
2. 실험 식이.....	- 20 -
3. 시료 채취.....	- 22 -
4. 간 지질 수준 측정.....	- 23 -

5.	DNA methylation microarray	- 24 -
5.1.	DNA 추출 및 메틸화 DNA 면역침강(methylated DNA immunoprecipitation, meDIP)	- 24 -
5.2.	DNA methylation microarray	- 24 -
5.3.	Differentially methylated regions (DMRs) 검색	- 25 -
5.4.	DMR의 유전체 주석 부여	- 25 -
5.5.	Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	- 26 -
6.	RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR	- 27 -
6.1.	RNA 추출	- 27 -
6.2.	cDNA 합성	- 28 -
6.3.	Real-time PCR.....	- 29 -
7.	통계 분석	- 31 -
IV.	실 험 결 과	- 32 -
1.	체중, 간 무게, 식이 섭취량	- 32 -
2.	간 지질 수준.....	- 34 -
3.	전장 유전체 수준의 DNA 메틸화.....	- 36 -
4.	DMR의 유전자 주석 부여 및 IPA 분석	- 41 -
5.	DNA 메틸화에 따른 유전자 발현 변화.....	- 44 -
V.	고 찰	- 52 -
VI.	요 약	- 58 -
	참 고 문 헌	- 60 -
	Abstract	- 67 -

표 목 차

Table 1. Composition of the diets¹.....	- 21 -
Table 2. Sequences of primers used for real-time PCR.....	- 30 -
Table 3. Body weight, weight gain, liver weight, liver weight per body weight, and diet intake of CRCd, CD, and HFD groups.	- 33 -
Table 4. Liver triacylglycerol and cholesterol concentrations.....	- 35 -
Table 5. IPA network analysis result of genes annotated back from DMRs of HFD vs. CD comparison.	- 42 -
Table 6. IPA network analysis result of genes annotated back from DMRs of HFD vs. CRCd comparison.....	- 43 -
Table 7. Genes in the network 1s of the HFD vs. CD and HFD vs. CRCd comparisons in relation to one of the top diseases and functions of its network.....	- 47 -

그림 목차

Figure 1. Epigenetic mechanism provides the link between environmental factors and phenotypical changes during the whole lifetime (Tammen et al. 2013).....	6 -
Figure 2. DNA methylation and demethylation (Reik and Walter 2001).	9 -
Figure 3. DNA methylation sites and gene expression.	10 -
Figure 4. Periods of life in which DNA methylation processes take place (Campion et al. 2009).	13 -
Figure 5. Metabolic alteration resulting in hepatic triacylglyceride accumulation in insulin-resistant states (Browning and Horton 2004).-	15 -
Figure 6 The experimental design.....	19 -
Figure 7. Heat maps of DMPs in each comparison.	38 -
Figure 8. Number of DMRs in each comparison.	39 -
Figure 9. Distance between DMRs and their annotated genes.	40 -
Figure 10. Network 1 of the HFD vs. CD comparison.....	48 -
Figure 11. Relative <i>Casp1</i> mRNA expression in the HFD group compared to the CD group.....	49 -
Figure 12. Network 1 of the HFD vs. CRCD comparison.....	50 -
Figure 13. Relative <i>Ndufb9</i> mRNA expression in the HFD group compared to the CRCD group.....	51 -

약 어 목 록

5mC; 5-methylcytosine

ANOVA; analysis of variance

C; cytosine

Casp1; caspase 1

CD; control diet

CGI; CpG island

CHARM; comprehensive high-throughput array for relative methylation

CpG; 5'-cytosine-phosphate-guanine-3'

CRCD; calorie-restricted control diet

DMP; differentially methylated probe

DMR; differentially methylated region

DNMT; DNA methyltransferase

G; guanine

Gapdh; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

GREAT; Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool

HFD; high-fat diet

IL; interleukin

IPA; Ingenuity Pathway Analysis

LSD; least significant difference

MeDIP; methylated DNA immunoprecipitation

mRNA; messenger RNA

NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease

NASH; nonalcoholic steatohepatitis

Ndufb9; NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 9

Non-meDIP; non-methylated DNA immunoprecipitation

RT-PCR; real time polymerase chain reaction

TSS; transcription start site

I. 서 론

비만 인구가 증가하고, 비만으로 인한 심혈관 질환, 당뇨, 암 등의 비전염성 만성질환의 심각성이 공중 보건의 주요 이슈로 떠오르면서, 전 세계적으로 비만에 대한 관심이 높아지고 있다. Lim et al. (2012)의 연구결과에 따르면, 2010년 세계적으로 3백 4십만 명이 과체중 및 비만에 의해 사망하였고, 손실수명년수(LYY, years of life lost)의 4 %, 장애보정손실년수(DALY, disability adjusted life years)의 4 %가 과체중 및 비만에 기인한다고 한다.

비만의 발병은 유전적 요인, 환경적 요인, 그리고 식이요인이 복합적으로 작용하여 일어나는데, 식이요인 중에서는 고지방식이(high-fat diet, HFD)로 대표되는 고열량식이가 비만의 주요 원인으로 손꼽힌다. 잘못된 식습관으로 인해 비만해지면 내당불내성, 고혈압, 고지혈증과 같은 증상으로 대표되는 대사증후군이 생길 가능성이 높아지며, 비알코올성 지방간의 발병 위험도 함께 증가한다(Eckel et al. 2005).

대사증후군과 비알코올성 간질환은 일반적으로 인슐린 저항성(insulin resistance)과 연관이 있는 것으로 알려져 있지만 아직 명확한 원인 기전은 밝혀지지 않았다(Eckel et al. 2005; Samuel et al. 2004). 특히 간은 탄수화물·지질·단백질의 합성, 분해, 저장 등 대사의 중심이 되는 기관으로, 비만한 경우 간 조직에서 인슐린 저항성이 나타나고

간의 탄수화물 및 지질대사가 변화하며, 결과적으로 비알코올성 지방간의 위험이 높아진다고 알려져 있다(Saltiel and Kahn 2001; Kahn and Flier 2000; Kotronen et al. 2007). 뿐만 아니라 간에 지방이 축적되면 간 조직에서 염증성 지표들이 높아진다고 보고되고 있다(Ridker et al. 2003; Mertens et al. 2006; Park et al. 2010).

최근에는 후성유전학적 연구 방법 및 기술이 발전함에 따라, 비만으로 인해 간 조직에서 대사 교란이 일어나고 염증반응이 증가하는 원인을 후성유전학 차원에서 규명하고자 하는 연구들이 증가하고 있다. 후성유전적 변화는 DNA 염기 서열의 변화 없이 유전자 발현을 조절할 수 있으며, 가역적이고 대를 이어 유전되는 특징을 가진다. 특히, DNA 메틸화는 후성유전학적 변화의 주요 기전으로서, 식이요인이 건강에 미치는 영향을 밝히기 위해 많은 연구자들이 이에 관심을 가지고 연구하고 있다(Choi and Friso 2010). 고지방식이 DNA 메틸화 패턴 변화에 미치는 영향에 대한 연구는 간 조직을 비롯하여 지방조직과 근육 조직을 대상으로 이루어지고 있다. 특히 본 연구에서 관심을 가지고 있는 간 조직과 관련하여서는 고지방식이 DNA 메틸화 변화에 미치는 영향을 개별 유전자 수준에서 분석한 연구가 대다수이며 high-throughput 방법을 통한 전장 유전체 수준(genome-wide)의 연구는 매우 부족한 실정이다. 임신 기간부터 시작하여 성인기까지 지속적으로 고지방식을 섭취한 경우의 DNA 메틸화 패턴 변화를 전장 유전체 수준에서 분석한 연구가 있지만(Zhang et al. 2015), DNA 메틸화 패턴은 임신/수유 기간 뿐만 아니라 성인기에도 영향을 받을 수 있기 때문에(Richardson 2003)

성인기에 고지방식이를 섭취하는 것이 전장 유전체 차원의 DNA 메틸화 패턴 변화에 미치는 영향 역시 연구가 필요하다.

본 연구에서는 고지방식으로 인한 비만 마우스의 간 조직 DNA 메틸화 패턴 변화를 전장 유전체 수준에서 분석하고자 한다. 이를 위해 high-throughput DNA methylation array 법과 생물정보학적 분석 기법, 그리고 RT-PCR 방법을 사용하여, 고지방식으로 유도된 비만 마우스에서 간 조직의 DNA 메틸화 패턴의 변화를 분석하고 DNA 메틸화가 유전자 발현 조절에 미치는 영향을 확인하였다.

II. 문 헌 고 찰

1. 후성유전학 개요

후성유전학(epigenetics)은 DNA 염기 서열의 변화, 즉 유전자 변이 없이 일어나는 유전자 발현 및 기능의 변화에 대한 학문이다. 후성유전학적 변화는 세포분열 시에도 유지되는 안정적인 변화이면서도 환경적 요인에 의해 다시 변화될 수 있다는 점에서 가역적이라는 특징이 있다(Jaenisch and Bird 2003).

후성유전학적 변화에는 대표적으로 히스톤 변형(histone modification)과 DNA 메틸화(DNA methylation)가 있다. 히스톤 변형은 번역후변형(post-translational modification)의 일종으로서, 히스톤 꼬리라 불리는 히스톤 단백질의 N 말단(N-terminal histone tails)에 메틸기, 아세틸기, 인산기 등이 공유결합하는 것을 일컫는다. 히스톤 변형으로 인해 염색질이 느슨해지면(open chromatin structure), 전사인자(transcription factor)가 DNA에 접근하는 것이 용이해지고, 결과적으로 해당 부위의 유전자 전사가 증가하게 된다. 반대로 염색질이 응축되면(closed chromatin structure), 유전자 전사가 감소한다. 염색질의 이러한 구조적 변화를 염색질 재편성(chromatin remodeling)이라고 부른다. 일반적으로 히스톤 아세틸화는 전사를 활성화시키고(Roth et al. 2001), 히스톤 메틸화는 전사를 활성화시키기도 하고 억제시키기도 한다고 알려져 있다(Greer and Shi 2012). DNA 메틸화는 DNA 염기 중 하나인 시토신(cytosine, C)에

메틸기가 결합하는 변형을 말하며 일반적으로 DNA 메틸화는 전사 억제로 이어진다. DNA 메틸화는 아래의 ‘2. DNA 메틸화’에서 자세히 다루도록 한다.

이러한 후성유전학적 변화는 환경 독소, 약물, 식이, 스트레스, 운동, 항원 등의 환경적 요인에 의해 영향을 받으며, 이들은 전 생애주기에 걸쳐 일어난다(Jaenisch and Bird 2003; Tammen et al. 2013).

Figure 1은 환경적 요인에 의한 후성유전학적 변화와 그에 따른 표현형의 변화를 도식화한 것이다.

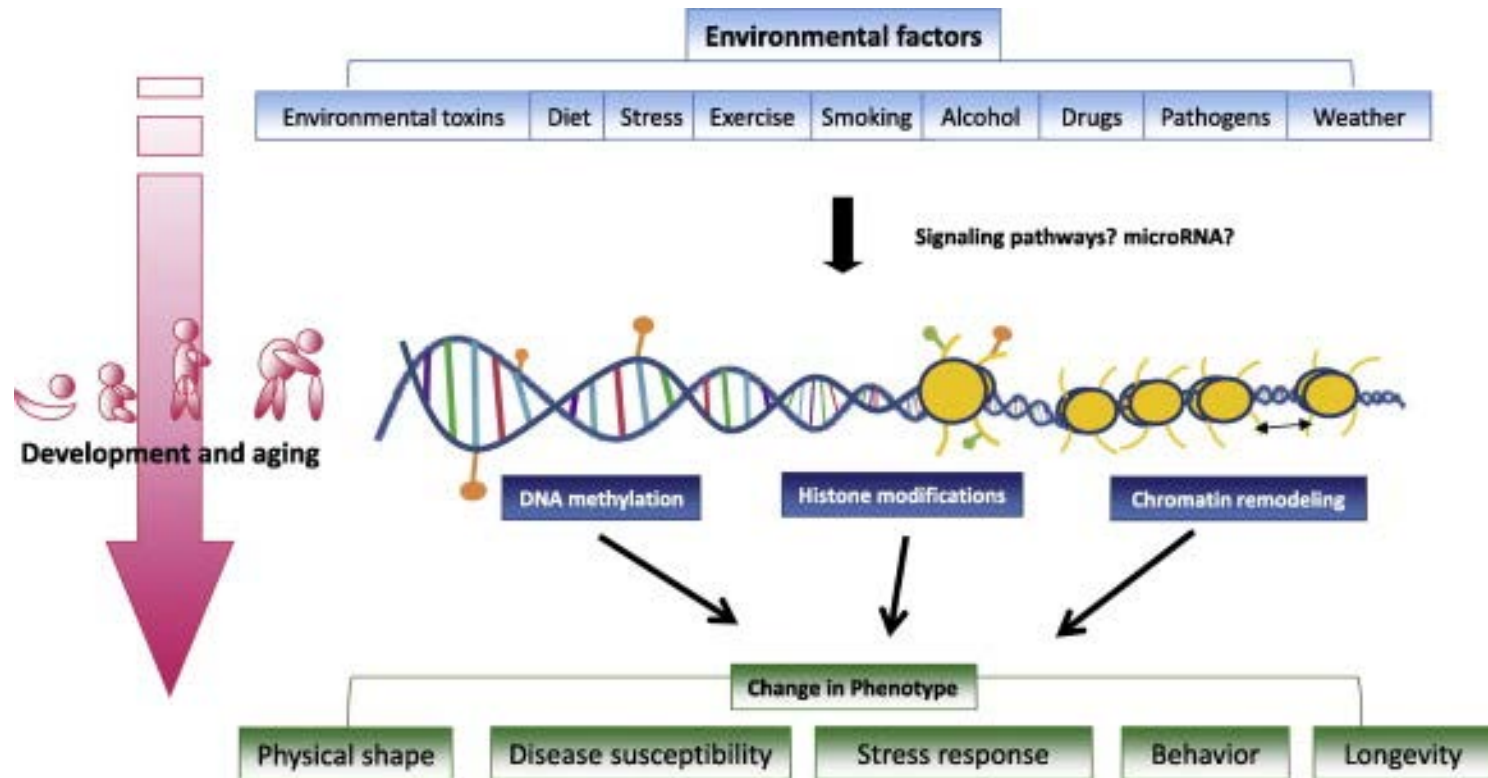


Figure 1. Epigenetic mechanism provides the link between environmental factors and phenotypical changes during the whole lifetime (Tammen et al. 2013).

2. DNA 메틸화

2.1. DNA 메틸화와 유전자 발현 조절 기능

후성유전학적 변화의 가장 대표적인 예는 DNA 메틸화이다. 포유류 세포의 경우, DNA 메틸화는 CpG (5'-cytosine-phosphate-guanine-3') 디뉴클레오타이드의 시토신(cytosine, C)이 5-메틸시토신(5-methylcytosine, 5mC)로 전환되는 것을 말한다. CpG는 CpG island (CGI)라 불리는 약 1 kb 길이의 CpG가 풍부한 DNA 서열에 주로 분포하는데, 대부분의 CGI는 transcription start site (TSS) 주변 promoter region과 첫 번째 exon에 위치한다고 알려져 있다(Larsen et al. 1992; Jones 1999).

DNA 메틸화에는 메틸기 공여자로서 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM)이 필요하며, 반응 촉매제로서 DNA 메틸기전달효소(DNA methyltransferase, DNMT)가 필요하다. 포유류의 활성형 DNMT에는 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B가 있다(Subramaniam et al. 2014; Reik and Walter 2001). Maintenance methyltransferase라고도 불리는 DNMT1은 DNA 복제(DNA replication) 시 주형 DNA 사슬의 메틸화 정보를 새로이 합성되는 DNA 사슬(daughter strand)에 전달하여 DNA 복제 후에도 DNA 메틸화가 유지될 수 있게 해준다. 반면에 *de novo* methyltransferase라 불리는 DNMT3A와 DNMT3B는 *de novo* 메틸화가 활발히 이루어지는 배아발달 단계에서 발현이 높아지는 효소이며, 종양 세포와 같이 메틸화 변화가 많은 세포에서도 이 두 효소의 발현이 높아진다. DNA 탈메틸화는 DNA 복제 시 DNMT1 발현이 저하된 상태에서 주형 DNA 사슬의 메틸화 정보가 새로이 복제된 사슬에

전달되지 못함으로써 수동적으로 이루어지거나(replication-dependent passive demethylation), 직접적으로 메틸기를 제거하는 방법에 의해 이루어진다(replication-independent active demethylation) (Reik and Walter 2001). DNA 메틸화/탈메틸화는 Figure 2에 나타내었다.

Promoter region의 메틸화가 미치는 영향은 그 세포의 유전적/세포학적 조건에 따라 달라질 수 있다(Jones 2012). 그러나 일반적으로 포유류 세포에서는 promoter region의 메틸화에 의해 유전자 발현이 전사 시작 단계(initiation)에서부터 억제된다고 알려져 있다(Jones 1999). 반면에, 유전자 내부(intragenic) 메틸화 변화가 유전자 발현에 미치는 영향에 대해서는 의견이 엇갈리고 있다. 포유류 세포에서 유전자 내부 메틸화 수준은 일반적으로 mRNA 발현 수준과 양의 상관관계를 보인다고 알려져 있다(Jones 1999). 즉, TSS의 downstream 위치에서는 메틸화가 일어나더라도 전사의 신장 단계(elongation)를 방해하지 못한다는 것이다. 그러나 최근에는 유전자 내부 메틸화가 전사의 신장 단계를 방해하여 유전자 전사의 효율성을 떨어뜨릴 수 있으며(Lorincz et al. 2004), 특히 첫 번째 exon의 DNA 메틸화가 mRNA 발현을 억제한다는 연구 결과도 보고되고 있어서(Brenet et al. 2011), 유전자 내부의 DNA 메틸화가 유전자 발현을 억제할 가능성 또한 고려할 필요가 있다. 메틸화 위치에 따른 유전자 발현 변화는 Figure 3에 도식화하였다.

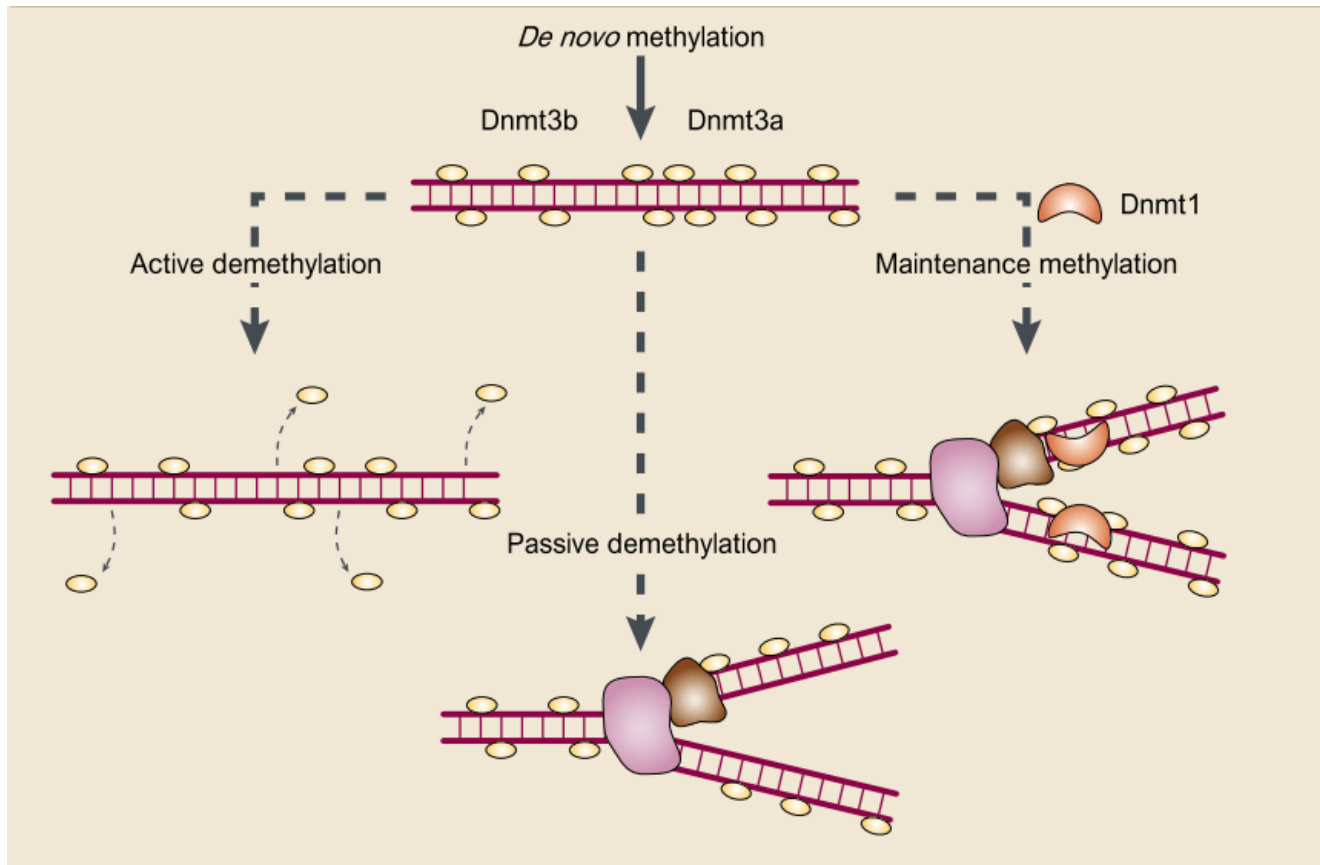


Figure 2. DNA methylation and demethylation (Reik and Walter 2001).

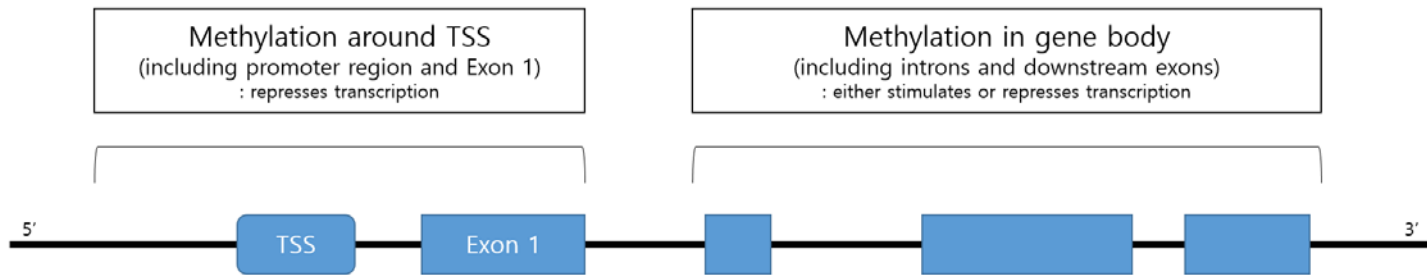


Figure 3. DNA methylation sites and gene expression.

2.2. DNA 메틸화와 생애주기

포유류의 DNA 메틸화는 발생 과정 동안 역동적으로 변화한다. 수정과 함께 난할기(cleavage)에 접어들면 정자와 난모세포 유전체에서 DNA 메틸화 기록이 모두 지워지고, 착상(implantation)이 이루어짐과 함께 *de novo* 메틸화가 전장 유전체에 걸쳐 일어난다(Jaenisch 1997). 이를 후성유전학적 리프로그래밍(epigenetic reprogramming)이라고 하며, 이후의 DNA 메틸화 패턴은 비교적 안정적으로 유지된다.

DNA 메틸화 패턴의 변화는 발달 과정에서 가장 크게 변화하지만, 출생 후 노년기에 이르기까지 식이요인을 포함한 다양한 환경적 요인에 의해 지속적으로 변화한다. 노화가 진행됨에 따라 DNA는 전장 유전체에 걸쳐 저메틸화(genome-wide hypomethylation) 경향을 나타낸다(Jaenisch and Bird 2003). 그러나 전반적인 저메틸화 경향은 주로 반복적인 염기 서열에서 나타나기 때문에 이러한 변화가 기능적으로 유의미한 영향을 미칠지에 대해 규명하기 위해서는 추후 연구가 더 필요하다(Jaenisch and Bird 2003). 반면에 특정 조직의 몇몇 유전자들은 과메틸화 경향을 보인다. 이러한 현상은 암 세포 및 종양 조직을 대상으로 한 연구에서 주로 연구되고 있는데, 종양억제유전자들의 발현 억제에 관여하는 CGI가 노화에 의해 과메틸화(CGI hypermethylation, local hypermethylation)되는 경향이 있다고 보고되고 있다(Jaenisch and Bird 2003; Das and Singal 2004).

즉, 노화가 진행됨에 따라 종양억제유전자 promoter region의 CGI 과메틸화가 일어나면 암 발병 위험이 증가하게 된다. 생애주기에 따른 DNA 메틸화 변화는 Figure 4에 나타냈다.

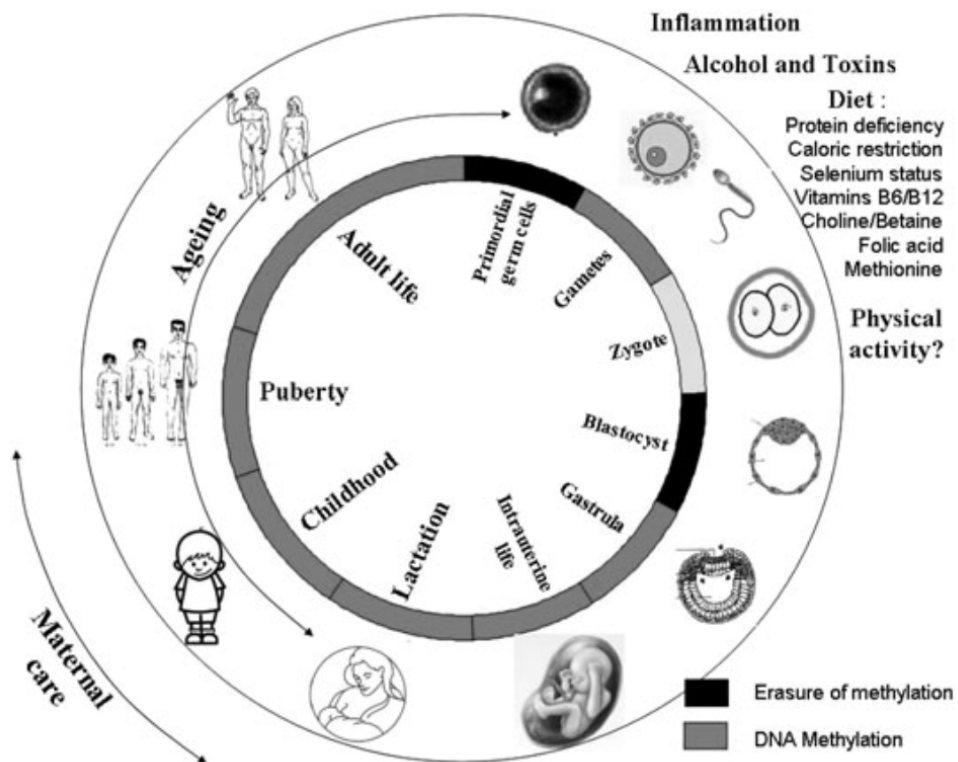


Figure 4. Periods of life in which DNA methylation processes take place (Campion et al. 2009).

3. 비만에 의한 간 조직에서의 변화

3.1. 비만과 간의 탄수화물 및 지질 대사 변화

잘못된 식습관으로 인해 비만해지면 인슐린 저항성이 생길 가능성이 높아진다. 인슐린 저항성이 커지면 혈당 관리가 그만큼 어려워지므로 이에 대한 보상작용으로 췌장은 더 많은 인슐린을 분비하게 된다. 지방 세포에서는 호르몬 감수성 리파아제(hormone-sensitive lipase, HSL)가 활성화되어 HSL에 의한 지방분해가 촉진되고 유리지방산(free fatty acid, FFA)이 혈중으로 방출된다. 혈중 유리지방산 농도가 증가하게 되면 간으로 유입되는 유리지방산의 양도 많아지게 된다. 뿐만 아니라, 고인슐린혈증에 의해 간 SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c) 발현이 촉진되고 고혈당증에 의해 간 ChREBP (carbohydrate response element binding protein)가 활성화되면, 지질 합성 유전자들(lipogenic genes)의 발현이 증진되어 지방질 생합성(lipogenesis)이 촉진된다. 간으로 유입된 유리지방산과 새로이 합성된 유리지방산이 증가함에 따라, 유리지방산은 중성지방(triacylglyceride) 합성에 이용되어 간 세포에 저장되거나, apolipoprotein B와 함께 초저밀도 리포단백질(very low-density lipoprotein, VLDL) 합성에 사용되어 혈중으로 방출된다. Figure 5는 인슐린 저항성으로 인한 간 세포의 탄수화물 및 지질 대사 변화와 지방 축적 기전을 나타낸 것이다.

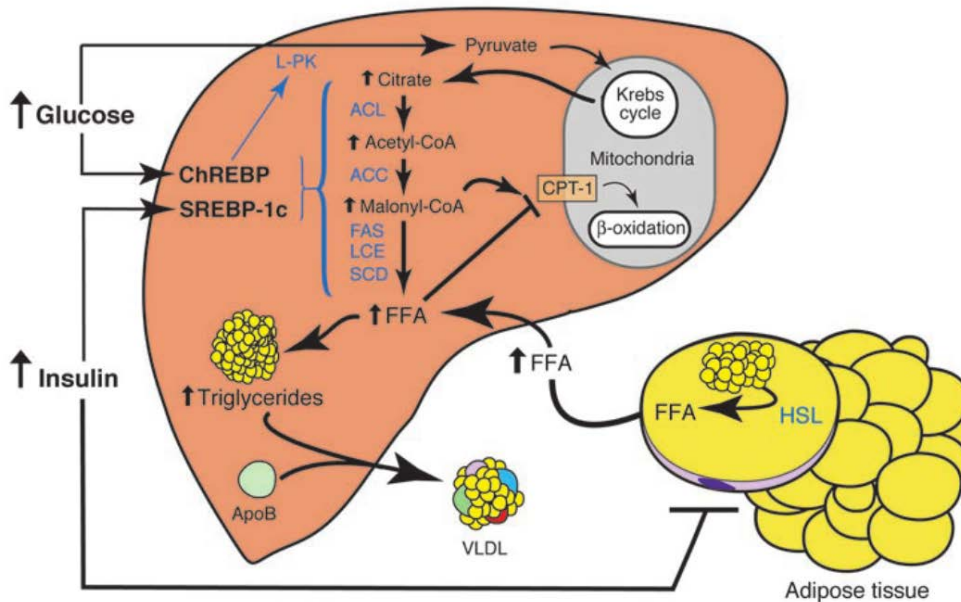


Figure 5. Metabolic alteration resulting in hepatic triacylglyceride accumulation in insulin-resistant states (Browning and Horton 2004).

ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACL, ATP citrate lyase; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase; FAS, fatty acid synthase; FFA, free fatty acid; HSL, hormone-sensitive lipase; LCE, long-chain fatty acyl elongase; L-PK, liver-type pyruvate kinase; SCD, stearoyl-CoA desaturase; VLDL, very low-density lipoprotein

3.2. 비만과 간 조직의 염증반응

비만은 만성 정도 염증반응(chronic low-grade systematic inflammation)과 관련이 있다고 알려져 있으며, 간에 있어서 이러한 염증반응은 단순 지방증(simple steatosis)을 비알코올성 지방간염(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 간 섬유화(hepatic fibrosis), 심지어는 간 암(hepatocellular carcinoma)으로 발전시키는 원인이 된다.

비만으로 인해 인슐린 저항성이 높아지면, 지방 세포와 면역 세포, 간 조직 세포들의 염증반응이 항진된다(Sun and Karin 2012). 지방 세포는 축적된 지방을 분해하여 유리지방산 형태로 방출하고 혈중 유리지방산 농도의 증가는 다양한 면역세포의 활성화를 야기한다. 또한 지방 세포에서 사이토카인(e.g. $\text{TNF-}\alpha$, Interleukin-6 (IL-6), $\text{IL-1}\beta$, IL-8, IL-10, IL-18, and IL-17)의 분비가 촉진된다. 이렇듯 지방 조직의 사이토카인 분비 증가로 인해 간 조직 내로 유입되는 사이토카인이 많아지면, 간 조직 자체의 사이토카인 분비도 더욱 촉진되어 간 조직 내의 염증반응이 심화된다. 특히 염증성 사이토카인인 IL-6는 비만으로 인한 염증반응의 주요 지표로 사용되는데, 비만으로 인해 간 조직 쿠퍼세포(Kupffer cell)와 간 성상세포(hepatic stellate cell), 그리고 간 세포(hepatocyte)에서 IL-6 분비가 증가한다고 알려져 있다.

4. 고지방 식이와 간 조직 DNA 메틸화 변화

다양한 영양소 및 식이형태에 의해 DNA 메틸화가 변화한다고 알려져 있으며(Choi and Friso 2010), 고지방식이에 의한 영향 역시 많은 연구자들에 의해 분석되고 있다. 고지방식이는 주로 대사 과정과 만성 염증 반응과 관련된 유전자들의 메틸화 변화와 연관이 있는 것으로 보인다. 해당과정에 관여하는 유전자 *Gck* (glucokinase)와 *Pklr* (pyruvate kinase liver and red blood cell)는 고지방식으로 유도된 비만 랫드의 간 조직에서 유전자 발현이 감소하였고, 이는 고지방식으로 인한 DNA 과메틸화와 연관이 있었다(Jiang et al. 2011). 지질 대사에 관여하는 유전자인 *Scd1* (stearoyl-CoA desaturase 1) (Schwenk et al. 2013)과 *Mtp* (microsomal triglycerol transfer protein) (Chang et al. 2010)는 고지방식이에 의해 과메틸화 경향을 보였으며, 이는 유전자 발현 저하로 이어졌다. 또한, 임신 및 수유기의 어미 랫드가 고지방식을 섭취하였을 때 새끼 랫드의 간 조직에서 세포주기 관련 유전자인 *Cdkn1a*가 저메틸화되었고 유전자 발현은 저하되었다(Dudley et al. 2011). 임신 기간부터 성인기에 이르기까지 지속적으로 고지방식이를 섭취한 랫드의 DNA 메틸화 변화 패턴은 세포 형태발생, 발달 및 성장, 자극에 대한 반응, 신호 전달, 그리고 중성지방 생합성과 같은 간 발달 및 간 지방증 관련 신호 체계와 연관이 있었다(Zhang et al. 2015).

III. 연구 방법

1. 실험 설계 및 실험 동물 사육

7 주령의 수컷 C57BL/6N 마우스를 (주) 중앙 실험 동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 서울대학교 수의과대학 동물 사육장 specific pathogen free (SPF) room 에서 사육하였고, 사육 환경은 온도 25 ± 2 °C, 습도 55 ± 10 %, 명암 12 시간 주기 조건으로 일정하게 유지되었다. 실험 동물은 1 주일 간의 적응 기간을 거친 후 군 당 평균 체중이 유사하도록 3 개 군(대조식이군: Control Diet, CD; 고지방식이군: high-fat diet, HFD; 열량제한대조식이군: calorie-restricted control diet, CRCDD)에 임의 배정하였고, 실험 식이는 16 주 간 공급하였다. 식이 섭취량은 매일, 체중은 주 1 회 측정하였다. 16 주 간의 실험 식이 기간이 완료된 후에는 모든 실험 동물을 12 시간 동안 금식시켰고 CO₂ 과다 흡입 방법을 이용하여 안락사시켰다. 실험 설계 개요는 Figure 6 에 도식화하였다.

동물 실험의 전 과정은 서울대학교 동물 실험 윤리위원회(Seoul National University Institutional Animal Care and Use Committee; SNU IACUC)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다(승인번호: SNU-090710-1).

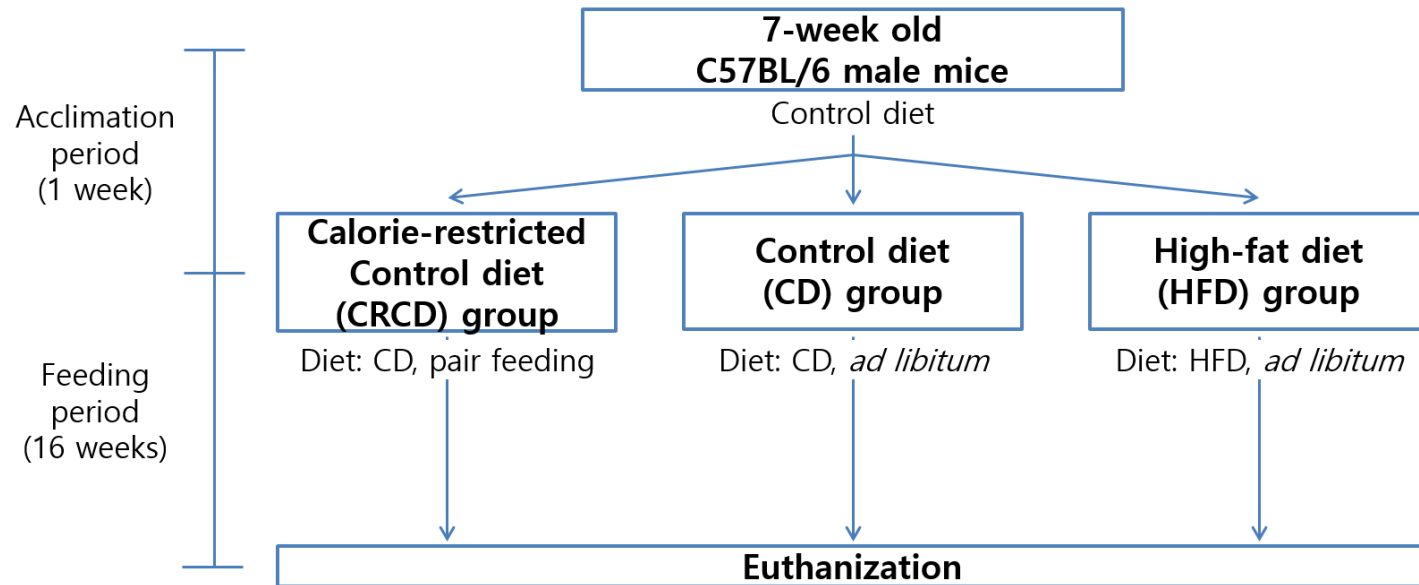


Figure 6 The experimental design.

2. 실험 식이

실험 식이는 AIN-76A 정제 식이 조성을 바탕으로 하여 주문 제작하였으며(Research Diets Inc. NJ, USA), 지방 함량에 따라 대조식이(control diet, CD; 10 % fat, 70 % carbohydrate, 20 % protein; 3.85 kcal/g)와 고지방식이(high-fat diet, HFD; 60 % fat, 20 % carbohydrate, 20 % protein; 5.24 kcal/g)의 두 종류로 공급하였다. 실험 식이의 조성은 Table 1 에 나타내었다.

실험 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4 °C에서 보관하였다. CD 군과 HFD 군은 CD 와 HFD 를 각각 자유급여(ad libitum)하였고, CRCD 군은 HFD 군 마우스의 섭취량을 측정하여 동량의 CD 를 CRCD 군 마우스에 제공하는 pair feeding 을 시행하였다. 멸균된 3 차 탈 이온수는 자유급여하였다.

Table 1. Composition of the diets¹.

Ingredients (g)	CD (10 % kcal fat)	HFD (60 % kcal fat)
Casein	200	200
L-Cysteine	3	3
Corn starch	315	0
Maltodextrin	35	125
Sucrose	250	68.8
Cellulose	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	20	245
Mineral mix ²	10	10
Dicalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate	16.5	16.5
Vitamin mix ³	10	10
Choline bitartrate	2	2
Total grams	1000	1000
Energy density	3.85 kcal/g	5.24 kcal/g

1. Resource: Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ, USA.
2. 10 g of mineral mix (Research diet, S10026): 1.0 g of sodium, 1.6 g of chloride, 0.5 g of magnesium, 0.33 g of sulfate, 1.6 g of molybdate, 2.0 g of chromium, 6.0 g of copper, 37 mg of iron, 59 mg of magnesium, 0.2 mg of iodate, 0.9 mg of fluoride, 0.16 mg of selenite, 29 mg of zinc, 3.99 g of sucrose.
3. 10 g of vitamin mix (Research diet, V10001): 4000 IU of vitamin A, 1000 IU of Vitamin D3, 50 IU of vitamin E, 0.5 mg of menadione, 0.2 mg of biotin, 10 µg of vitamin B12, 2 mg of folate, 30 mg of niacin, 16 mg of panthothenic acid, 7 mg of vitamin B6, 6 mg of vitamin B2, 6 mg of vitamin B1, 9.78 g of sucrose.

3. 시료 채취

간은 적출 후 쓸개를 제거하고 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 세척한 뒤 무게를 측정하였다. 간 조직은 분석 전까지 -80 °C에서 보관하였다.

4. 간 지질 수준 측정

Folch 방법을 응용하여 간 조직으로부터 지질을 추출하였다(Folch et al. 1957). 간 조직 샘플 30 mg은 PBS 60 μ L로 균질화하였다. 균질화 용액에 클로로포름/메탄올(2:1 by volume) 용액 1,200 μ L를 첨가하여 17 시간 동안 상온에 방치한 뒤 $2,000 \times g$, 4 $^{\circ}C$ 조건에서 10 분 간 원심분리하였다. 분리된 하층액을 새 튜브에 옮겨 담고, 질소 가스로 용매를 날려보낸 후 100 μ L 이소프로판올에 충분히 녹였다.

추출된 지질 중 중성지방 및 콜레스테롤은 키트(Asan pharmaceutical, Korea)를 사용하여 비색적 효소적 분석법(colorimetric enzymatic analysis)에 따라 측정하였다. 간 조직 시료와 표준 시료를 96-well plate의 각 well에 분주하고 효소 용액 300 μ L를 각 well에 첨가한 뒤, 37 $^{\circ}C$ 에서 10 분(중성지방) 또는 5 분(콜레스테롤) 간 방치하였다. 그 다음, 500 nm 파장에서 분광광도계(spectramax 190. Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 시료의 흡광도로부터 도출된 표준 곡선을 기준으로 하여 혈청 시료의 총 중성지방 및 콜레스테롤 농도를 계산하였다.

5. DNA methylation microarray

5.1. DNA 추출 및 메틸화 DNA 면역침강(methylated DNA immunoprecipitation, meDIP)

표준 페놀/클로로포름/이소아밀알코올(25:24:1 by volume) (Invitrogen Life Technologies) 방법에 따라 DNA를 추출하였다. DNA는 100 % 에탄올과 3 mol/L 아세트산 나트륨(pH 5.2)를 이용하여 침전시켰고, 침전물을 Tris-EDTA buffer에 다시 녹인 뒤, sonication을 통해 200 – 1000 bp 길이의 무작위 DNA 조각으로 잘랐다. 그 다음, 조각 난 각 DNA 시료는 반으로 나뉘서 절반은 그대로 두고(non-methylated DNA immunoprecipitation, non-meDIP), 나머지 절반은 메틸화된 시토신 염기에 대한 항체(Diagenode)를 사용하여 면역침강을 수행하였다(methylated DNA immunoprecipitation, meDIP) (Jin et al. 2010). MeDIP과 non-meDIP DNA는 whole genome amplification kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 사용자 프로토콜에 명시된 방법에 따라 증폭시켰다.

5.2. DNA methylation microarray

MeDIP과 non-meDIP 분획은 각각 Cy5와 Cy3로 형광 염색(Nimblegen kit, Roche)한 뒤, high-throughput NimbleGen 3×720 k CpG Island plus RefSeq promoter array (Roche)에 경쟁적으로 hybridization을 시켰다. 이 array는 마

우스 유전체 상에서 알려져 있는 모든 promoter와 CGI들에 대한 probe들을 포함하고 있다. 스캐너(NimbleGen microarray scanner MS 200, Roche)를 이용하여 형광 신호를 탐지하였고, 전용 소프트웨어(NimbleScan software, Roche)를 사용하여 me-DIP과 non-meDIP에 대한 \log_2 비를 계산하였다.

5.3. Differentially methylated regions (DMRs) 검색

MeDIP DNA methylation array 결과는 R studio 상에서 comprehensive high-throughput array for relative methylation (CHARM) 방법을 응용하여 분석하였다(Irizarry et al. 2008; Tammen et al. 2015). 비교는 HFD 군과 CD 군, 그리고 HFD 군과 CRCD 군 간의 비교를 수행하였다. CHARM 방법에 따라, differentially methylated probe (DMP)는 비교 군 간의 t test P value < 0.01 , 평균차 > 0.5 인 probe이었고, differentially methylated regions (DMRs)은 비교 군 간 t test P value < 0.005 인 유전적으로 인접한 probe들을 최소 3개 이상 묶어서 도출하였다. CHARM 패키지는 Bioconductor에서 배포한 무료 소프트웨어 프로그램이다(<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/charm.html>).

5.4. DMR의 유전체 주석 부여

모든 DMR은 Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT)

을 이용하여 근접 유전자를 검색한 뒤 주석을 부여하였다(McLean et al. 2010). 주석 부여에 사용된 데이터베이스는 UCSC mm9 마우스 유전체였다. 본 연구에서는 DMR이 어떤 유전자의 TSS로부터 5.0 kb upstream 또는 1.0 kb downstream 범위 안에 들어올 경우 그 유전자 주석을 부여하였다. DMR이 이 범위 안에 들어오지 않는 regulatory domain이더라도 실험적 증거에 의해 해당 유전자를 직접적으로 조절한다고 알려졌다면 그 유전자 주석을 부여하였다.

5.5. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

HFD와 CD 군 또는 HFD와 CRCDD 군 간의 DMR에 부여한 유전자 주석 리스트를 바탕으로 Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity® System, <http://www.ingenuity.com>)를 수행하였다. 이를 통해 HFD에 의해 유의적인 DNA 메틸화 변화를 보인 유전자들이 어떤 생물학적 network와 관련이 있는지 확인하였다. IPA network analysis는 Fisher's exact test를 기반으로 하며, 분석을 위해 입력한 유전자 리스트와 관련성이 높은 생물학적 network를 제시한다. Fisher's exact test의 P value는 농화된(enriched) network의 유의성을 나타내며 이는 network score로 표현된다.

6. RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR

6.1. RNA 추출

간 조직 50 mg을 취하여 RNAiso Plus (Takara, Shiga, Japan) 1 ml에 넣고 균질화한 뒤 실온에서 5 분 동안 방치해 두었다. 그 다음 클로로포름 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 200 μ L를 첨가하고 15 초 가량 vortexing한 뒤 실온에서 3 분 동안 두었다. 이를 $12,000 \times g$, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 15 분 간 원심분리 하고, 분리된 투명한 상층액은 새 튜브에 옮겨 담았다. 여기에 이소프로판올(Sigma) 500 μ L를 첨가한 뒤 가볍게 vortexing하여 실온에 10 분 동안 두었다. $12,000 \times g$, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 이번에는 10 분 동안 원심분리 하여 튜브 바닥에 pellet이 가라앉게 하였다. 가라앉은 pellet 이외의 용액은 버리고 pellet이 담긴 튜브에 75 % 에탄올 1 ml을 더하여 1회 세척 하였다. 마지막으로 $7,500 \times g$, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 2 분 동안 원심분리 하여 에탄올을 제거하고, 남아있는 물기는 튜브 뚜껑을 열고 거꾸로 비스듬히 세운 채로 15 분 가량 방치하여 완전히 말렸다. 건조된 pellet은 0.05 % DEPC-treated distilled water 50 μ L에 녹였다. Pellet을 녹인 용액은 분광광도계(DU530, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도 및 순도를 확인하였다. 파장 260 nm와 280 nm의 흡광도비(Abs260/Abs280)가 1.8 이상임을 확인한 후 측정된 농도를 바탕으로 모든 RNA 샘플을 0.5 μ g/ μ L의 농도로 희석하였

다. 추출된 RNA의 질은 희석된 샘플을 1 % agarose gel에 전기영동으로 분리하여 확인하였다. 사용 시까지 - 80 °C에서 보관하였다.

6.2. cDNA 합성

추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해서 PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 사용하였고 사용자 프로토콜에 명시된 방법을 따랐다. 요약하면 다음과 같다. 0.2 ml PCR tube에 RNA stock (0.5 µg/µL) 4 µL, dNTP Mixture (10 mM) 1 µL, oligo dT primer(50 µM) 1 µL, RNase free dH₂O 4 µL를 혼합하여 65 °C에서 5 분 동안 인큐베이션 한 후 곧바로 얼음 위에 올려놓고 5 분 동안 식혔다. 그 다음, PrimeScript™ II buffer (5×) 4 µL, RNase inhibitor (40 U/µL) 0.5 µL, PrimeScript RTase (200 U/µL) 1 µL, RNase free dH₂O 4 µL를 첨가하였다. 결과적으로 만들어진 이 반응 용액은 Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 (Life technologies co., Foster city, CA, USA)을 사용하여 42 °C에서 50 분 동안 반응을 시키고 95 °C에서 5 분 동안 효소를 불활성화시킨 다음 4 °C에서 30 분 동안 두어 온도를 낮춰줬다. 합성된 cDNA 샘플은 사용 시까지 - 20 °C에서 보관하였다.

6.3. Real-time PCR

MicroAmp® Fast Reaction Tubes와 Optical 8-Cap Strip (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에 합성된 cDNA 샘플의 5배 희석액 1 μ L, forward와 reverse primer 각각 0.4 μ L, ROX reference dye ($50\times$) 0.4 μ L, SYBR Premix Ex Taq ($2\times$) 10 μ L, autoclaved distilled water 7.8 μ L을 혼합한 총 20 μ L 부피의 반응 용액을 분주하였다. SYBR Premix와 ROX reference dye는 Takara 사의 제품을 사용하였으며, 각 target gene에 대하여 특이적으로 검색한 primer는 Biomedic 사(Bucheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 합성을 의뢰하여 사용하였다. 각 target gene 별 primer의 염기 서열은 Table 2에 나타내었다. 분주 과정에서 생긴 공기 방울은 spin down하여 완전히 제거한 뒤 StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에서 real-time PCR을 수행하였다. Holding stage는 95 $^{\circ}$ C에서 30 초 동안 유지하였고, cycling stage는 95 $^{\circ}$ C에서 5 초 동안 변성(denaturatiod), 60 $^{\circ}$ C에서 30 초 동안 결합 및 신장(annealing & extension)하는 일련의 과정을 40 회 반복하였으며, melt curve stage는 95 $^{\circ}$ C에서 15 초, 60 $^{\circ}$ C에서 60 초, 95 $^{\circ}$ C에서 15 초로 설정하여 진행하였다. 각 실험은 duplicate하여 평균값을 사용하였으며, 각 유전자의 발현량은 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 법에 따라 군 별로 상대정량하였다 (Livak and Schmittgen 2001). Target gene의 CT 값은 *Gapdh*를 reference gene으로 하여 보정하였다.

Table 2. Sequences of primers used for real-time PCR.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Casp1</i>	TGGCTTCTTATTGGCACGAT	GGTCTTGTGACTTGGAGGACA
<i>Ndufb9</i>	TGCCAGTAATCTAAGCACCATTC	ACCTGACCCACCAGCAGAAG
<i>Gapdh</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

Casp1, Caspase 1; *Ndufb9*, NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 9; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

7. 통계 분석

세 그룹 간의 체중, 식이 섭취량, 간 무게, 간 지질 수준, 그리고 mRNA 발현 수준은 일원분산분석(one-way ANOVA)을 통해 비교하였고, ANOVA 결과가 유의적일 경우 개별 그룹 간 비교를 위해 Fisher's Least Significant Difference (LSD) test로 사후검정을 수행하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 나타냈으며 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

IV. 실험 결과

1. 체중, 간 무게, 식이 섭취량

HFD 군의 평균 식이섭취량은 CD 군에 비해 14.3 % 낮았다. 그러나 평균 열량 섭취량은 HFD 군이 CD 군에 비해 17.8 % 높았다. CRCd 군의 경우, 평균 열량 섭취량이 CD 군에 비해 13.3 % 낮았다. 16 주 간의 실험 종료 후, 세 군의 체중과 간 무게는 HFD 군이 두 대조군(CD 및 CRCd 군)에 비해 유의적으로 높았고 CD 군은 CRCd 군에 비해 체중과 간 무게가 유의적으로 높았다(Table 3).

Table 3. Body weight, weight gain, liver weight, liver weight per body weight, and diet intake of CRCD, CD, and HFD groups.

	CRCD	CD	HFD	<i>P</i> value
Body weight at 0 week (g)	22.9 ± 0.2	22.2 ± 0.3	23.2 ± 0.4	0.070
Body weight at 16 week (g)	28.5 ± 0.8 ^a	37.9 ± 0.6 ^b	48.70 ± 1.2 ^c	< 0.001
Body weight gain (g)	5.6 ± 0.7 ^a	15.7 ± 0.6 ^b	25.5 ± 1.0 ^c	< 0.001
Liver weight (g)	1.1 ± 0.0 ^a	1.9 ± 0.1 ^b	2.9 ± 0.2 ^c	< 0.001
Liver weight per body weight (g/100 g body weight)	4.0 ± 0.1 ^a	5.1 ± 0.1 ^b	6.0 ± 0.3 ^b	< 0.001
Daily food intake (g/day)	3.0 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.0 ^b	3.0 ± 0.1 ^a	< 0.001
Daily energy intake (kcal/day)	11.7 ± 0.3 ^a	13.5 ± 0.1 ^b	15.9 ± 0.4 ^c	< 0.001

Values are expressed as means ± SEM, n = 7 per group.

One-way ANOVA was used to determine the statistical differences among diet groups, followed by Fisher's LSD tests ($P < 0.05$).

2. 간 지질 수준

HFD로 인한 간의 지질 축적 수준 변화를 확인하기 위해 간의 중성지방 및 콜레스테롤 수준을 측정하였다(Table 4). 세 군의 간 중성지방 및 콜레스테롤 수준은 유의적 차이를 보였다. HFD 군과 CD 군의 중성지방 수준은 CRCD 군에 비해 유의적으로 높았다. 콜레스테롤 수준은 HFD 군이 두 대조군(CD 및 CRCD 군)보다 유의적으로 높았으며 CD 군은 CRCD 군보다 유의적으로 높았다.

Table 4. Liver triacylglycerol and cholesterol concentrations.

	CRCD	CD	HFD	<i>P</i> value
Liver triacylglycerol (mg/g tissue)	16.4 ± 3.8 ^a	35.0 ± 4.4 ^b	43.0 ± 3.3 ^b	< 0.001
Liver triacylglycerol (µg/mg protein)	94.7 ± 12.4 ^a	309.2 ± 47.0 ^b	399.6 ± 44.4 ^b	< 0.001
Liver cholesterol (mg/g tissue)	1.0 ± 0.4 ^a	4.7 ± 1.7 ^b	8.4 ± 1.2 ^c	0.002
Liver cholesterol (µg/mg protein)	4.7 ± 0.7 ^a	42.9 ± 16.1 ^b	78.2 ± 14.6 ^b	0.005

Values are expressed as means ± SEM, n = 6 to 7 per group.

One-way ANOVA was used to determine the statistical differences among diet groups, followed by Fisher's LSD tests ($P < 0.05$).

3. 전장 유전체 수준의 DNA 메틸화

전장 유전체 수준의 DNA 메틸화 수준을 분석하기 위하여 HFD 와 CD, HFD 와 CRCDD, 그리고 CR 와 CRCDD 군 간의 비교를 수행하였다. Heat-map matrix (Figure 7) 상에 표현된 probe 는 모두 DMP 이다. Heat map 상에서 두 대조군(CRCDD 와 CD 군) 간의 차이는 보이지 않았다. 한편, HFD 군과 CRCDD 군 간 비교에서의 clustering effect 는 HFD 와 CD 군 간의 비교에서보다 강하게 나타났다.

유전체적으로 인접한 probe 들을 서로 묶어 DMR 을 도출한 뒤, 각 군 간 비교에서의 DMR 개수를 살펴보았다(Figure 8). HFD 와 CD 군 간의 DMR 개수는 HFD 를 자유급여 하였을 때 DNA 메틸화 변화 수준을 나타내며, DMR (HFD 군에서 91 DMR 의 과메틸화, 145 DMR 의 저메틸화) 236 개만큼의 DNA 메틸화 변화가 HFD 에 의해 일어났다. 한편, HFD 와 CRCDD 군 간의 DMR 개수는 HFD 군의 섭취량만큼 pair feeding 한 대조군인 CRCDD 군 과의 비교에서 HFD 에 의한 DNA 메틸화 변화 수준을 나타내며, DMR (HFD 군에서 41 DMR 의 저메틸화, 102 DMR 의 과메틸화) 143 개만큼의 DNA 메틸화 변화가 HFD 에 의해 일어났다. 결과적으로 HFD 를 CRCDD 군과 비교했을 때보다 HFD 를 CD 군과 비교했을 때 더 많은 DMR 이 도출되었다(143 vs. 236). CD 와 CRCDD 군 간의 비교에서는 214 개의 DMR 이 도출되었다. 모든 군 간 비교에서

도출된 DMR 은 대부분(83 %) 주석을 부여 받은 유전자의 TSS 주변 ± 5 kb 범위 내에 가깝게 위치하고 있었고, 따라서 이들 DMR 의 DNA 메틸화 변화는 유전자 발현 변화에 영향을 미쳤을 가능성이 있다(Figure 9).

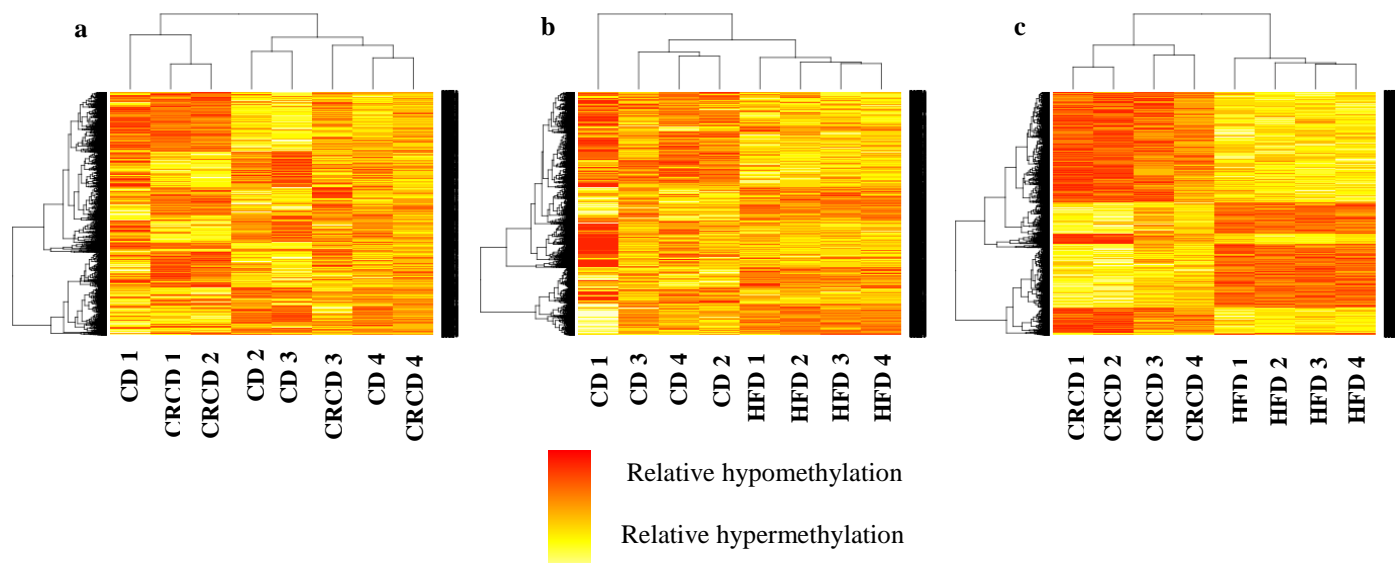


Figure 7. Heat maps of DMPs in each comparison.

a. CD vs. CRC comparison. b. HFD vs. CD comparisons. c. HFD vs. CRC comparison.



Figure 8. Number of DMRs in each comparison.

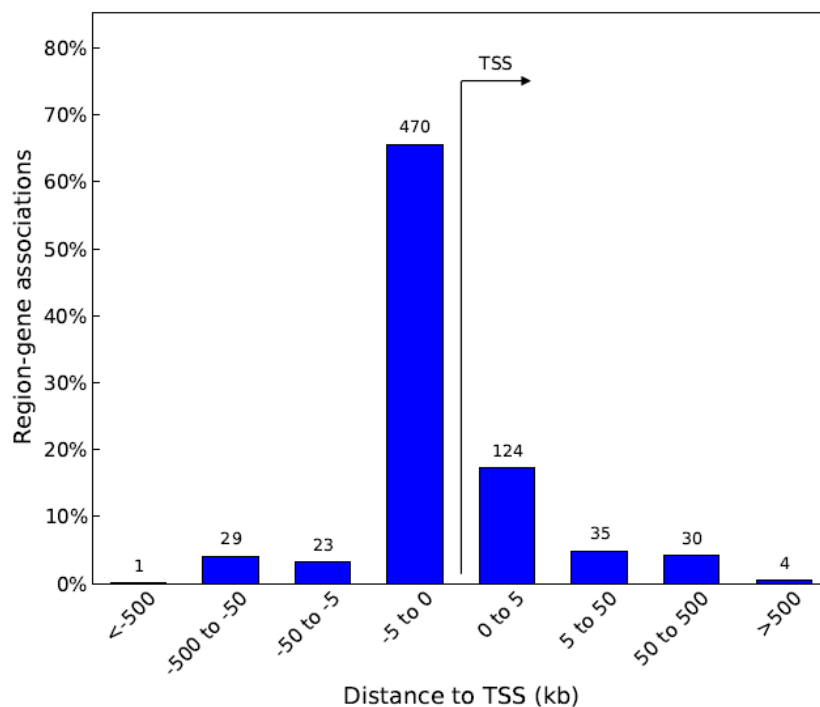


Figure 9. Distance between DMRs and their annotated genes.

The number of DMRs which falls within the designated intervals relative to their annotated genes' TSSs are presented above each bar. This graph was generated via Stanford University's GREAT Analysis.

4. DMR의 유전자 주석 부여 및 IPA 분석

마우스 유전체의 유전자 주석이 부여된 DMR 은 IPA 를 사용하여 network analysis 를 시행하였다(Table 5, Table 6). HFD 와 CD 군 간의 비교에서 주석을 부여 받은 총 280 유전자 중 13 개 유전자들은 위장관 질환(gastrointestinal disease), 간 질환(hepatic system disease), 간 지방증(liver steatosis) 관련 network 와 연관이 있었고(network 1: network score = 16), 5 개 유전자들은 탄수화물 대사(carbohydrate metabolism), 소분자 생화학(small molecule biochemistry), 세포사 및 생존(cell death and survival) 관련 network 와 연관이 있었다(network 2: network score = 6). 이 두 개의 network 모두 대부분의 DMR 이 HFD 군에서 저메틸화 경향을 보였다.

한편, HFD 와 CRCD 군 간의 비교에서는 주석을 부여 받은 총 179 개의 유전자 중 5 개의 유전자들이 지질 대사(lipid metabolism), 분자 운송(molecular transport), 소분자 생화학(small molecule biochemistry) 관련 network 와 연관이 있었고(network 1: network score = 5), 2 개 유전자들은 심혈관 질환(cardiovascular disease), 세포 조립 및 조직화(cellular assembly and organization), 세포 발달 (cellular development)과 관련된 network 와 연관이 있었다(network 2: network score = 3). 이 두 개의 network 모두 대부분의 DMR 이 HFD 군에서 과메틸화 경향을 보였다.

Table 5. IPA network analysis result of genes annotated back from DMRs of HFD vs. CD comparison.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	ACACA,ACOX1,B4GALNT1,C6, C1QB ,CASP1,CD36,CEBPB, CTNNB1,Cyp2c54(includes others), FABP4,FASN,FBXW7,FGG,G6PC, GPAM,GPD1,HNF1A, KLF9 ,KRT8, LEPR,MAP3K1, Mup1 (includes others) ,NFE2L2,NR1I3,PPARA, PPARG, PSMD14 ,SCD,SLC13A1, SLC38A4 ,SREBF1,Sult1d1,TLR4, TNF	16	13	- Gastrointestinal Disease - Hepatic System Disease - Liver Steatosis
2	ATP5A1 ,ATP5J,ATP6V1E1,G6PC, GCK,HNRNPB,IFNG,IGFBP1, IRS2,LEP,LEPR, MFN2 ,PIK3R1, RICTOR, RPL41	6	5	- Carbohydrate Metabolism - Small Molecule Biochemistry - Cell Death and Survival

Shade: Genes found in our data that were hypomethylated in HFD group.

Bold: Genes found in our data that were hypermethylated in HFD group.

Table 6. IPA network analysis result of genes annotated back from DMRs of HFD vs. CRCD comparison.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	ACSL1,ATP6V1G3,ATP7B,CARHSP1,COX6B2,CYP7A1,CYP8B1, EHMT2 ,FABP5,FASN,FGF21,FKBP4,G6PC,G6PD,GCK,GPAM,GPD1,HIST1H1C,HSD11B1,LEPR,MLXIPL, Mup1 (includes others) , NDUFB9 ,NFE2L2,NR1H3,OBP2B,PKLR,PPA1,PPARA,PPARG,PRMT5,PSME3,RICTOR,SCD,SREBF1	5	5	- Lipid Metabolism - Molecular Transport - Small Molecule Biochemistry
2	DHX58 ,DNASE2, IRF7 ,TRIM24	3	2	- Cardiovascular Disease - Cellular Assembly and Organization - Cellular Development

Shade: Genes found in our data that were hypomethylated in HFD group.

Bold: Genes found in our data that were hypermethylated in HFD group.

5. DNA 메틸화에 따른 유전자 발현 변화

DNA 메틸화 변화에 따라 유전자 발현 역시 변화하였는지 확인하기 위해서 IPA network 상의 유전자 mRNA 발현을 선택적으로 확인하였다. 본 연구에서 mRNA 발현을 확인한 유전자들은 다음과 같은 기준에 의해 선택되었다. 먼저, HFD와 CD 군 간의 비교에서 도출된 network 1, 그리고 HFD와 CRCd 군 간의 비교에서 도출된 network 1, 즉 가장 높은 network score 를 보인 1 번 network 에서 선택하였다. 그 다음, network 1 상의 유전자들 중, 지금까지 발표된 주요 선행 연구 결과들이 IPA 를 통해 제시된 각 network 1 과 관련된 주요 질환 및 분자생리학적 기능들과 일치하는 유전자들을 추려내었다(Table 7). HFD와 CD 군 간의 비교에서 도출된 network 1 은 간 질환과 관련된 network 였다. 이 network 에 포함되어 있는 유전자 *Casp1* (Caspase 1), *C6* (Complement component 6), 그리고 *C1qb* (Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide)는 염증반응에 관여하는 유전자들로서, 간 질환의 진행에 기여할 수 있는 유전자들이다. HFD와 CRCd 군 간의 비교에서 도출된 network 1 은 지질 대사와 관련된 network 였다. 이 network 에 포함되어 있는 유전자들 중 지질 대사에 관여한다고 알려져 있는 유전자에는 *Ndufb9* (NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 9)와 *Ehmt2* (Euchromatic histone-lysine B-methyltransferase 2)가 있다. 마지막으로, 이들 유전자들 중 HFD 군과 각

대조군들(CD 또는 CRCD 군) 간의 메틸화 수준 차가 가장 큰 유전자를 선택하여 mRNA 발현 변화를 확인하였다. 결과적으로 HFD 와 CD 군 간의 비교에서는(Figure 10) *Casp1* 이 선택되었고, HFD 와 CRCD 군 간의 비교에서는(Figure 12) *Ndufb9* 이 선택되었다.

HFD 와 CD 군 간의 비교에서(Figure 10), *Casp1* 은 network 1 의 중심 교점 (node) 중 하나이다. *Casp1* 은 염증성 caspase 인 caspase-1 을 전사하는 유전자로서 염증성 사이토카인인 IL-1 과 IL-18 의 활성화시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Franchi et al. 2009). 본 연구에서, *Casp1* 의 TSS로부터 약 1.5 kb upstream 에 위치한 CpG sites 가 HFD 군에서 CD 군에 비해 저메틸화되었다. 또한 mRNA 발현 수준을 측정한 결과, HFD 군의 *Casp1* mRNA 발현량이 CD 군에 비해 1.4 배 높았다($P = 0.018$) (Figure 11). 따라서, HFD 군의 *Casp1* 의 유전자 발현이 promoter region 의 저메틸화에 의해 증진되었을 가능성이 있다.

HFD 와 CRCD 군 간의 비교에서(Figure 12), *Ndufb9* 은 미토콘드리아 산화적 인산화 시스템의 complex I 을 구성하는 보조 소단위체(accessory subunit)를 전사하며(Smeitink and van den Heuvel 1999), complex I 의 조립 및 안정성 부여에 필수적인 핵유전자이다(Haack et al. 2012). *Ndufb9* 의 TSS로부터 약 2.6 kb downstream 에 위치한 CpG sites 가 HFD 군에서 CRCD 군에 비해 과메틸화되었다. 또한 HFD 군의 *Ndufb9* 의 mRNA

발현량은 CRCD 군의 절반 수준에 그쳤다($P = 0.041$) (Figure 13). 따라서 HFD 군의 *Ndufb9* 유전자 내부의(intragenic) DNA 메틸화에 의해 유전자 발현이 억제되었을 가능성이 있다.

Table 7. Genes in the network 1s of the HFD vs. CD and HFD vs. CRCd comparisons in relation to one of the top diseases and functions of its network.

	Network		Gene	Functions	Reference
	ID	top disease or function			
HFD vs. CD	1	Hepatic system disease	<i>C1qb</i>	• There is a widespread activation of complement system in NAFLD.	(Rensen et al. 2009)
			<i>C6</i>	• Complement components contributes to the development of alcoholic liver disease.	(Phieler et al. 2013)
			<i>Casp1</i>	• DNA methylation of <i>Casp1</i> decreases in NAFLD and hypomethylation of <i>Casp1</i> leads to enhancement of its mRNA expression.	(Murphy et al. 2013)
HFD vs. CRCd	1	Lipid metabolism	<i>Ndufb9</i>	• NDUFB9 constitutes oxidative phosphorylation system of the mitochondrion by transporting electron through inner mitochondrial membrane to generates a proton gradient, which provides the proton-motive force that is used in ATP synthesis	(Smeitink and van den Heuvel 1999)
			<i>Ehmt2</i>	• EHMT2, commonly known as G9A, acts as corepressor of transcription factor E4BP4 to repress <i>Fgf21</i> gene expression.	(Tong et al. 2013)
				* <i>Hepatic hormone FGF21 is highly induced by food starvation or ketogenic diet and suppressed by refeeding. As an adaptive response to fasting, FGF21 level increases resulting in promotion of lipolysis in the white fat tissue and keogenesis in the liver.</i>	

C1qb: Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide; *C6*: Complement component 6; *Casp1*: Caspase 1; *Ndufb9*: NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 9; *Gapdh*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Ehmt2*: Euchromatic histone-lysine B-methyltransferase 2.

Shade: Genes found in our data that were hypomethylated in HFD group.

Bold: Genes found in our data that were hypermethylated in HFD group.

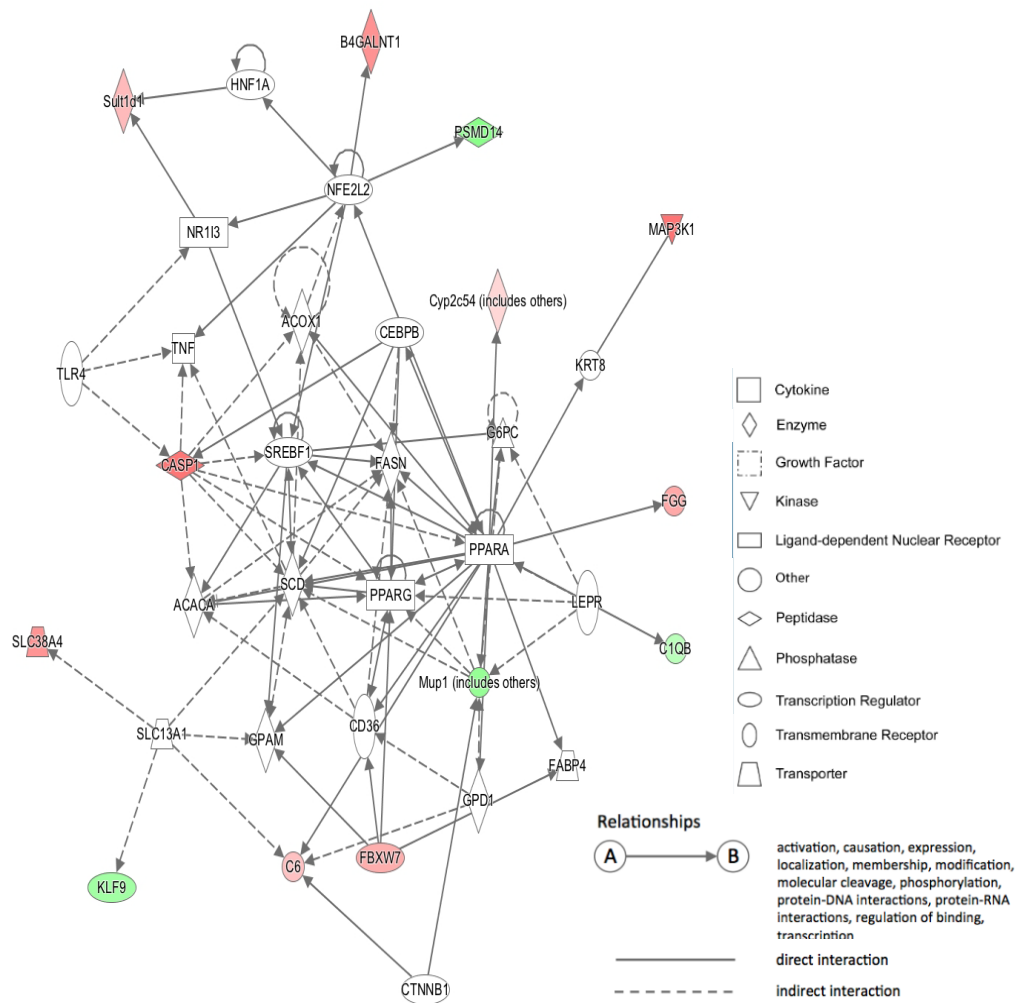


Figure 10. Network 1 of the HFD vs. CD comparison.

This network is involved in gastrointestinal disease, hepatic system disease, and liver steatosis.

Red: Genes found in our data that were hypomethylated in HFD group.

Green: Genes found in our data that were hypermethylated in HFD group.

The darker the color, the greater the difference in the degree of DNA methylation between the HFD and CD group.

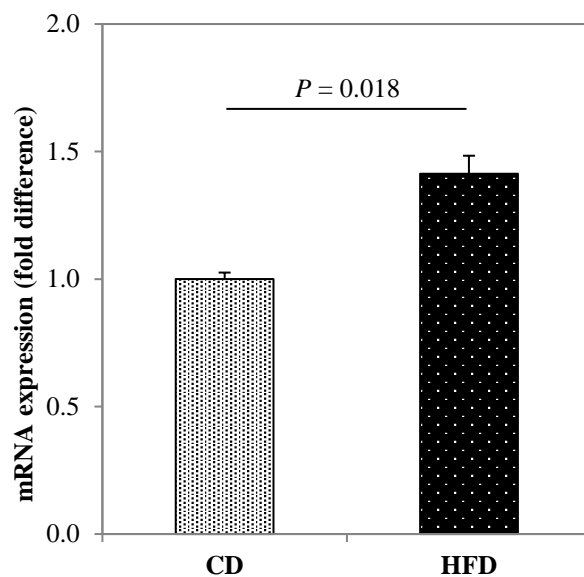


Figure 11. Relative *Casp1* mRNA expression in the HFD group compared to the CD group.

The value is expressed as mean \pm SEM, $n = 7$ for each group. Student's t test P value is shown.

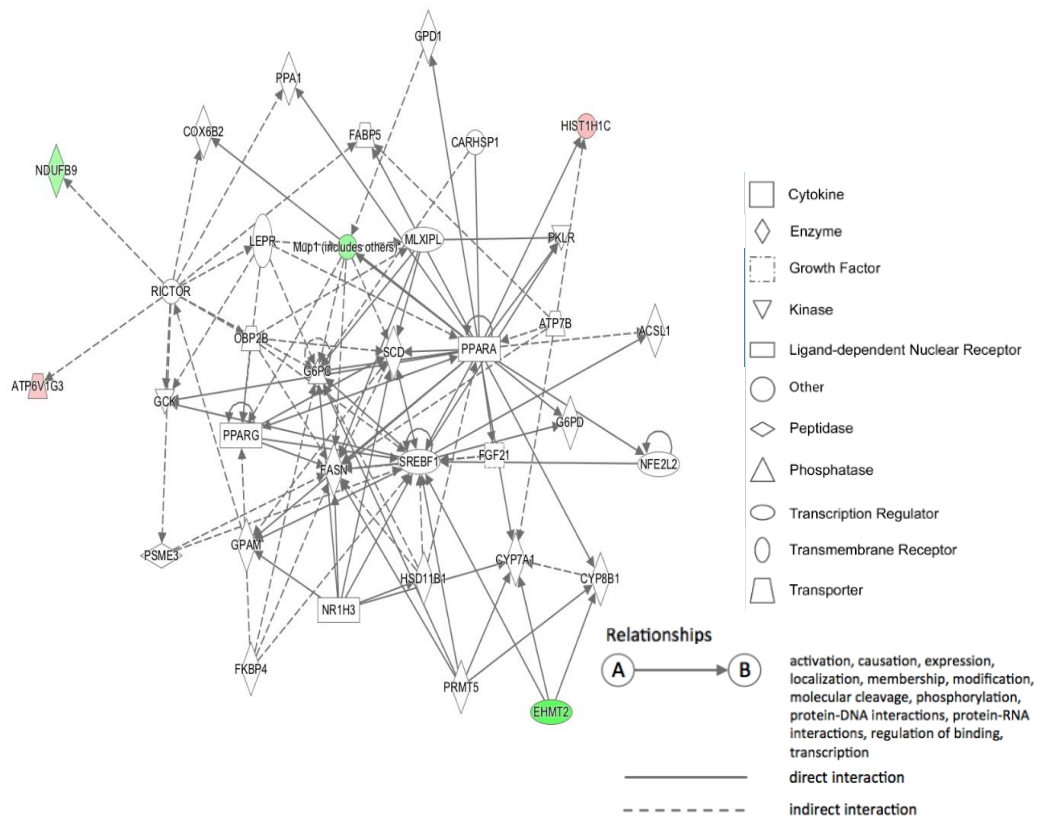


Figure 12. Network 1 of the HFD vs. CRCD comparison.

This network is involved in lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry.

Red: Genes found in our data that were hypomethylated in HFD group.

Green: Genes found in our data that were hypermethylated in HFD group.

The darker the color, the greater the difference in the degree of DNA methylation between the HFD and CRCD group.

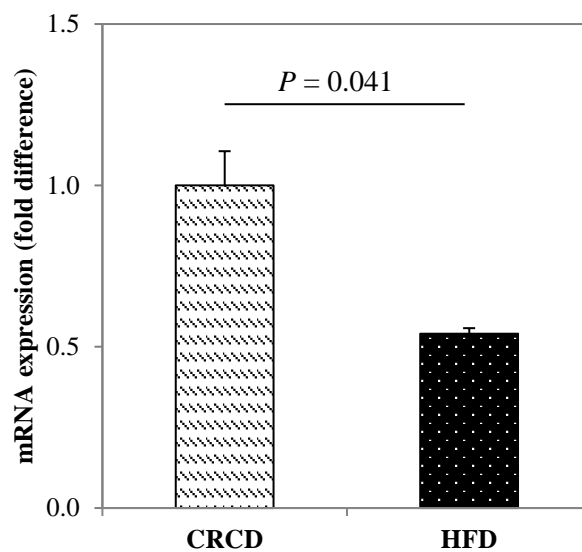


Figure 13. Relative *Ndufb9* mRNA expression in the HFD group compared to the CRCD group.

The value is expressed as mean \pm SEM, n = 6 to 7 for each group. Student's t test *P* value is shown.

V. 고 찰

본 연구에서는 고지방식이 섭취로 인한 비만이 전장 유전체 수준의 DNA 메틸화 패턴 변화에 미치는 영향을 두 개의 대조군(CD 및 CRCDC 군)과 비교하여 분석하였으며, DMR과 인접한 유전자들의 mRNA 발현이 DNA 메틸화에 의해 조절되었는지 검증하였다. 연구 결과, 지질 대사 및 간 지방증 관련 분자생리학적 network 상의 유전자들이 고지방식으로 인한 DMR과 연관이 있었다. 특히 HFD와 CD 군을 비교하였을 때, HFD 군의 *Casp1* (염증성 유전자) promoter region에 저메틸화된 DMR이 있었고 이는 HFD 군 *Casp1* 발현 증진의 원인 중 하나로 사료된다. 또한, HFD와 CRCDC 군을 비교하였을 때, HFD 군의 *Ndufb9* (에너지 대사 관련 유전자) 유전자 내부에 과메틸화된 DMR이 있었고 이는 HFD 군의 *Ndufb9* 발현 억제 원인 중 하나로 사료된다.

본 연구의 의의는 high-throughput 방법에 따라 고지방식으로 유도된 비만이 전장 유전체 수준의 DNA 메틸화 변화에 미치는 영향을 연구하였다는 점이다. 또한, 선행 연구에서 다른 연구자들이 임신 기간부터 시작하여 성인기에 이르기까지 고지방식을 지속적으로 섭취하였을 때 간 조직의 전장 유전체 DNA 메틸화 패턴이 변화하는 양상을 살펴보았다면(Zhang et al. 2015), 본 연구에서는 성인기에 한하여 고지방식이 섭취가 미치는 영향을 연구하였다는 점에서 의의가 있다. DNA 메틸화 패턴의 변화는 출생 초기 이후에도 일어나며 이 또한 중요한 변화이기 때문에(Richardson 2003), 본 연구 결과는 성인기의 DNA

메틸화 변화를 분석하였다는 점에서 기존의 연구 결과를 보완해 줄 수 있다.

HFD와 CD 군 간의 비교 및 HFD와 CRCd 군 간의 비교에서 도출된 DMP들은 모두 heat map 상에서 강한 clustering effect를 보였으며, 이는 고지방식이 DNA 메틸화 변화에 영향을 미쳤음을 시사한다. 또한 대부분의 DMR들은 TSS로부터 ± 5 kb 범위 내에 위치하고 있었다. 일반적으로 TSS 주변의 DNA 메틸화는 유전자 발현에 영향을 미친다고 알려져 있으므로 (Jones 2012), 본 연구에서 확인된 메틸화 변화는 유전자 발현에 영향을 미쳤을 가능성이 높다. 더불어, HFD와 CD 군 간의 비교에서 DMR과 IPA network 상의 유전자들은 모두 HFD 군에서 저메틸화 경향을 보였다. 이는 고지방식이 전장 유전체 수준의 DNA 저메틸화를 유도한다는 기존의 연구 결과와 일치한다(Zhang et al. 2015; Haack et al. 2012). 반면에, HFD와 CRCd 군 간의 비교에서는 DMR과 IPA network 상의 유전자들이 모두 HFD 군에서 과메틸화된 경향을 보였다.

고지방식에 의한 DNA 메틸화 변화는 HFD와 CD 군 간의 비교 및 HFD와 CRCd 군 간의 비교에서 모두 간 지질 축적 및 간 질환 관련 network와 관련이 있었다. 이는 고지방식이 간의 당 및 지질 대사, 염증반응, 그리고 간 발달과 관련된 특정 유전자들의 메틸화 수준을 변화시킨다는 기존의 연구 결과들과 일치한다(Jiang et al. 2011; Schwenk et al. 2013; Chang et al. 2010; Wang et al. 2014). 임신 기간부터 성인기까지의 지속적인 고지방식이 섭취가 간 조직의 전장 유전체 수준의 DNA 메틸화 패턴 변화에 미치는 영향을 분석한 한 연구에 따르면(Zhang et al.

2015), 고지방식이에 의한 DMR들은 세포 형태발생, 발달 및 성장, 자극에 대한 반응, 신호 전달, 그리고 중성지방 생합성과 같은 간 발달 및 간 지방증 관련 신호체계와 연관이 있다. 따라서 본 연구 결과는 이러한 선행연구 결과를 보완하여, 성인기의 고지방식이 섭취에 따른 DNA 메틸화 변화 역시 간의 지질 축적 및 간 질환 관련 network와 연관이 있음을 전장 유전체 차원의 실험 결과를 통해 보여준다.

DNA 메틸화 변화가 유전자 발현 조절로 이어지는지를 검증하기 위해 HFD와 CD 군 간의 비교에서 염증성 *Casp1* 유전자를 선택하여 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 인간의 *CASP1* 유전자는 경미한 NAFLD 환자에 비해 중증 NAFLD 환자에서 저메틸화 경향을 보이는 유전자로 알려져 있으며, *CASP1*의 mRNA 발현 수준은 CpG sites의 메틸화 수준과 역의 상관관계를 보인다고 한다(Murphy et al. 2013). 한편, 본 연구의 HFD 군에서는 간의 비대와 간 지질 축적량 증가가 관찰되었으나, 그 정도에 있어서 NAFLD로 진단되기에는 부족하다. 따라서 이러한 결과는 NAFLD 전 단계에서부터 고지방식이에 의한 *Casp1*의 메틸화 변화가 일어날 수 있음을 시사한다.

반면에 *Ndufb9* 유전자는 간 조직에서 고지방식이 또는 비만에 의해 발현이 조절되는지에 대해 연구된 바가 없다. 부고환 백색지방 조직에서는 *Ndufb9* 발현이 고지방식이 섭취로 인해 감소하였다는 보고가 있는데(Choi et al. 2015), 부고환 백색지방 조직의 *Ndufb9*의 발현 저하가 DNA 메틸화 변화에 의해 조절되는지는 알려진 바 없다. 본 연구 결과에서는 *Ndufb9*이 HFD 군의 간 조직에서 CD 군에 비해

과메틸화되었으며 HFD 군에서 *Ndufb9*의 mRNA 발현이 낮음을 확인하였다. 따라서 *Ndufb9*의 유전자 발현이 간 조직에서 고지방식이 섭취에 의해 저하되며, 간 조직의 경우 이러한 유전자 발현 저하가 DNA 메틸화에 의해 조절되었을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 또한 *Ndufb9*은 미토콘드리아의 산화적 인산화 시스템의 complex I을 구성하는 보조 소단위체를 전사하며 complex I의 조립 및 안정성 부여에 필수적인 유전자이기 때문에(Smeitink and van den Heuvel 1999; Haack et al. 2012), *Ndufb9*의 유전자 발현이 저하되면 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 에너지 대사 과정에 장애가 발생할 가능성이 있다.

*Casp1*과 *Ndufb9*의 DMR 위치 또한 주목할 필요가 있다. 본 연구에서는 *Casp1*의 DMR이 TSS로부터 약 1.5 kb upstream에 위치하였다. Promoter region의 메틸화가 미치는 영향은 그 세포의 유전적/세포학적 조건에 따라 달라질 수 있지만(Jones 2012), 적어도 포유류 세포에서는 promoter region의 메틸화에 의해 유전자 발현이 전사 시작 단계(initiation)에서부터 억제될 수 있다고 알려져 있다(Jones 1999). 본 연구에서도 CD 군에 대한 HFD 군의 *Casp1* promoter region 저메틸화가 유전자 발현 증진으로 이어졌으며 이러한 결과는 기존의 연구 결과와 일치한다. 한편, *Ndufb9*의 DMR은 TSS로부터 약 2.6 kb downstream에 위치하였다. 포유류 세포의 유전자 내부 메틸화 변화가 유전자 발현에 미치는 영향에 대해서는 현재 의견이 일치되지 않고 있다. 유전자 내부의 메틸화 수준이 mRNA 발현 수준과 양의 상관관계를 보인다, 즉 TSS의 downstream 메틸화는 전사의 신장 단계(elongation)를 방해하지

못한다는 주장이 있는 반면(Jones 1999), 유전자 내부 메틸화가 전사의 신장 단계를 방해하여 유전자 전사의 효율성을 떨어뜨릴 수 있다는 연구 결과도 보고된 바 있다(Lorincz et al. 2004). 본 연구에서는 *Ndufb9* TSS의 downstream에 HFD와 CRCD 군 간의 DMR이 위치하였다. 따라서 본 연구 결과에서는 *Ndufb9*의 유전자 내부 메틸화 변화가 HFD 군의 전사 신장 단계의 효율성을 떨어뜨리고 결과적으로 HFD 군의 *Ndufb9* mRNA 발현 수준을 감소시킨 것으로 사료된다.

본 연구는 성인기 고지방식이 섭취가 간 조직의 DNA 메틸화 변화에 미치는 영향을 전장 유전체 수준에서 분석하였다는 데 그 의의가 있다. 단, 본 연구를 해석함에 있어서 다음과 같은 한계점을 고려해야 할 것이다. 먼저, CRCD 군의 식이 섭취는 HFD 군 마우스의 섭취량을 측정하여 동량의 대조식이를 CRCD 군 마우스에 제공하는 방식으로 이루어졌다. 즉, CRCD 군의 총 식이 섭취량은 HFD 군과 동일하지만 미량영양소와 같은 각 영양소 섭취량은 HFD 군과 동일하지 않다. 따라서 HFD와 CRCD 군을 비교할 때는 CRCD 군의 미량영양소 섭취량이 HFD 군에 비해 적음으로 인해 발생하는 차이를 고려해야 한다. 실제로 CRCD 군의 미량영양소 섭취량은 HFD 군에 비해 약 14 % 적었지만 마우스의 영양소 필요량은 충족하는 수준이라고 할 수 있다(Nutrition 1995). 다음으로, DNA는 간 조직에서 추출되었기 때문에 DNA 메틸화 변화 양상을 세포 단위에서 설명할 수 없다. 따라서 세포 특이적인 연구를 위해서는 간 조직을 구성하는 세포 각각에 대한 실험이 이루어져야 할 것이다. 마지막으로, microarray는 DNA 메틸화 양상을

유전체 수준에서 분석할 수 있는 유용한 도구임에는 틀림없지만, microarray만으로는 개략적인 메틸화 변화의 추세만을 확인할 수 있다. 따라서 추후 연구에서는 메틸화 수준의 정확한 정량을 위해서 bisulfite pyrosequencing과 같은 추가 검증 방법이 필요하다.

VI. 요약

본 연구에서는 성인기 고지방식이 섭취에 의한 비만이 DNA 메틸화 패턴 변화에 미치는 영향을 두 개의 대조군(CD 및 CRCD 군)과 비교하여 전장 유전체 수준에서 분석하였다. 마우스를 세 개의 군으로 나누어 16 주 동안 두 개 군은 각각 지방의 열량비가 60 %인 HFD와 10 %인 CD를 자유급여하였고, 나머지 한 개 군은 HFD 군과 섭취량을 동일하게 맞춰 CD를 섭취시킨 CRCD를 제공하였다. 체중, 식이 섭취량, 간 무게 및 간 지질 함량을 측정하였고, 간 조직으로부터 추출한 DNA로 DNA methylation microarray를 수행하였다. HFD와 CD 군, 그리고 HFD와 CRCD 군 간의 DMR을 검색한 뒤 각 DMR에 대한 유전자 주석을 부여하여 IPA network analysis를 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- (1) 체중, 간 무게, 그리고 간 콜레스테롤 수준은 HFD 군이 두 대조군(CD 및 CRCD 군)에 비해 유의적으로 높았고, CD 군은 CRCD 군에 비해 유의적으로 높았다. 간 중성지방 수준은 HFD 군과 CD 군이 CRCD 군에 비해 유의적으로 높았다.
- (2) 모든 군 간 비교에서 검색된 DMR의 대부분(83 %)은 주석 유전자의 TSS 주변에 가까이 위치하고 있었고, 따라서 이러한 DNA 메틸화 변화는 유전자 발현 변화에 영향을 미쳤을 가능성이 높다.
- (3) 고지방식이에 의해 유도된 전장 유전체의 DNA 메틸화 패턴 변화는 지질 대사 및 간 지방증과 관련된 IPA network들과 관련이 있었다.

(4) HFD 군을 CD 군과 비교하였을 때, 염증성 유전자인 *Casp1*은 HFD 군의 promoter region에서 저메틸화 DMR이 검색되었으며, 이는 HFD 군의 *Casp1* 발현 증진으로 이어졌다. 또한, HFD을 CRCD 군과 비교하였을 때, 에너지 대사에 관여하는 유전자인 *Ndufb9*은 HFD 군의 *Ndufb9* 유전자 내부에서 과메틸화 DMR이 검색되었으며, 이는 HFD 군의 *Ndufb9* 발현 저하로 이어졌다.

이상의 결과를 통해 성인기의 고지방식이에 의한 비만은 간 조직의 DNA 메틸화 패턴 변화를 야기하며, 고지방식이에 의해 메틸화 수준이 변화된 유전자들은 지질 대사 및 간 지방증과 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 고지방식이에 의한 *Casp1* promoter region의 저메틸화와 *Ndufb9* 유전자 내부의 과메틸화는 각각 mRNA 발현 증진과 억제로 이어졌으며, 이를 통해 이들 유전자의 발현이 DNA 메틸화에 의해 조절되었음을 유추할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Brenet, F., M. Moh, P. Funk, E. Feierstein, A. J. Viale, N. D. Socci, and J. M. Scandura. 2011. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *Plos One* 6 (1):e14524.
- Browning, J. D., and J. D. Horton. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation* 114 (2):147-152.
- Campion, J., F. I. Milagro, and J. A. Martinez. 2009. Individuality and epigenetics in obesity. *Obesity Reviews* 10 (4):383-392.
- Chang, X., H. Yan, J. Fei, M. Jiang, H. Zhu, D. Lu, and X. Gao. 2010. Berberine reduces methylation of the MTTP promoter and alleviates fatty liver induced by a high-fat diet in rats. *J Lipid Res* 51 (9):2504-2515.
- Choi, M.-S., Y.-J. Kim, E.-Y. Kwon, J. Y. Ryoo, S. R. Kim, and U. J. Jung. 2015. High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflammation-related genes. *Br J Nutr* 113 (6):867-877.
- Choi, S.-W., and S. Friso. 2010. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr* 1 (1):8-16.

- Das, P. M., and R. Singal. 2004. DNA Methylation and Cancer. *J Clin Invest* 22 (22):4632-4642.
- Dudley, K. J., D. M. Sloboda, K. L. Connor, J. Beltrand, and M. H. Vickers. 2011. Offspring of Mothers Fed a High Fat Diet Display Hepatic Cell Cycle Inhibition and Associated Changes in Gene Expression and DNA Methylation. *Plos One* 6 (7):e21662.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365 (9468):1415-1428.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226 (1):497-509.
- Franchi, L., T. Eigenbrod, R. Munoz-Planillo, and G. Nunez. 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10 (3):241-247.
- Greer, E. L., and Y. Shi. 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13 (5):343-357.
- Haack, T. B., F. Madignier, M. Herzer, E. Lamantea, K. Danhauser, F. Invernizzi, . . . H. Prokisch. 2012. Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J Med Genet* 49 (2):83-89.

- Irizarry, R. A., C. Ladd-Acosta, B. Carvalho, H. Wu, S. A. Brandenburg, J. A. Jeddloh, . . . A. P. Feinberg. 2008. Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). *Genome Res* 18 (5):780-790.
- Jaenisch, R. 1997. EpigeneticsDNA methylation and imprinting: why bother? *Trends in Genetics* 13 (8):323-329.
- Jaenisch, R., and A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*.
- Jiang, M., Y. Zhang, M. Liu, M. S. Lan, J. Fei, W. Fan, . . . D. Lu. 2011. Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinology* 152 (4):1284-1289.
- Jin, S.-G., S. Kadam, and G. P. Pfeifer. 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res* 38 (11):e125.
- Jones, P. A. 1999. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 15 (1):34-37.
- Jones, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13 (7):484-492.
- Kahn, B. B., and J. S. Flier. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106 (4):473-481.

- Kotronen, A., J. Westerbacka, R. Bergholm, K. H. Pietilainen, and H. Yki-Jarvinen. 2007. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (9):3490-3497.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13 (4):1095-1107.
- Lim, S. S., T. Vos, A. D. Flaxman, G. Danaei, K. Shibuya, H. Adair-Rohani, . . . M. Ezzati. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380 (9859):2224-2260.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25 (4):402-408.
- Lorincz, M. C., D. R. Dickerson, M. Schmitt, and M. Groudine. 2004. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11 (11):1068-1075.
- McLean, C. Y., D. Bristor, M. Hiller, S. L. Clarke, B. T. Schaar, C. B. Lowe, . . . G. Bejerano. 2010. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* 28 (5):495-501.
- Mertens, I., A. Verrijken, J. J. Michiels, M. Van der Planken, J. B. Ruige, and L. F.

- Van Gaal. 2006. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes* 30 (8):1308-1314.
- Murphy, S. K., H. Yang, C. A. Moylan, H. Pang, A. Dellinger, M. F. Abdelmalek, . . . A. M. Diehl. 2013. Relationship Between Methylome and Transcriptome in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 145 (5):1076-1087.
- Nutrition, N. R. C. U. S. o. L. A. 1995. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition*. Washington D.C.: National Academies Press.
- Park, E. J., J. H. Lee, G.-Y. Yu, G. He, S. R. Ali, R. G. Holzer, . . . M. Karin. 2010. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* 140 (2):197-208.
- Phielers, J., R. Garcia-Martin, J. D. Lambris, and T. Chavakis. 2013. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. *Semin Immunol* 25 (1):47-53.
- Reik, W., and J. Walter. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2 (1):21-32.
- Rensen, S. S., Y. Slaats, A. Driessen, C. J. Peutz-Kootstra, J. Nijhuis, R. Steffensen, . . . W. A. Buurman. 2009. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 50 (6):1809-1817.

- Richardson, B. 2003. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2 (3):245-261.
- Ridker, P. M., J. E. Buring, N. R. Cook, and N. Rifai. 2003. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 107 (3):391-397.
- Roth, S. Y., J. M. Denu, and C. D. Allis. 2001. Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 70 (1):81-120.
- Saltiel, A. R., and C. R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414 (6865):799-806.
- Samuel, V. T., Z.-X. Liu, X. Qu, B. D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, . . . G. I. Shulman. 2004. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem* 279 (31):32345-32353.
- Schwenk, R. W., W. Jonas, S. B. Ernst, A. Kammel, M. Jähnert, and A. Schürmann. 2013. Diet-dependent Alterations of Hepatic Scd1 Expression are Accompanied by Differences in Promoter Methylation. *Horm Metab Res* 45 (11):786-794.
- Smeitink, J., and L. van den Heuvel. 1999. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet* 64 (6):1505-1510.
- Subramaniam, D., R. Thombre, A. Dhar, and S. Anant. 2014. DNA Methyl

- Transferases: A novel target for Prevention and Therapy. *Frontiers in Oncology* 4.
- Sun, B., and M. Karin. 2012. Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology* 56 (3):704-713.
- Tammen, S. A., S. Friso, and S.-W. Choi. 2013. Epigenetics: The link between nature and nurture. *Molecular Aspects of Medicine* 34 (4):753-764.
- Tammen, S. A., L. K. Park, G. G. Dolnikowski, L. M. Ausman, S. Friso, and S.-W. Choi. 2015. Hepatic DNA hydroxymethylation is site-specifically altered by chronic alcohol consumption and aging. *Eur J Nutr*:1-10.
- Tong, X., D. Zhang, K. Buelow, A. Guha, B. Arthurs, H. J. M. Brady, and L. Yin. 2013. Recruitment of Histone Methyltransferase G9a Mediates Transcriptional Repression of Fgf21 Gene by E4BP4 Protein. *J Biol Chem* 288 (8):5417-5425.
- Wang, L.-j., H.-w. Zhang, J.-y. Zhou, Y. Liu, Y. Yang, X.-l. Chen, . . . H.-l. Zhu. 2014. Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 25 (3):329-336.
- Zhang, Y., H. Wang, D. Zhou, L. Moody, S. Lezmi, H. Chen, and Y. X. Pan. 2015. High-fat diet caused widespread epigenomic differences on hepatic methylome in rat. *Physiol Genomics* 47 (10):514-523.

Abstract

Genome-wide hepatic DNA methylation changes in HFD-induced obese mice

AhRam Yoon

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

High-fat diet (HFD) induces obesity, a major risk factor for cardiovascular disease and cancer, while calorie restriction diet can extend life span by reducing the risk of those diseases. It is also known that health effects of diet are partially conveyed through epigenetic mechanism including DNA methylation. In the present study, we investigate the genome wide epigenetic effects of high-fat diet (HFD) on obesity by measuring genome-wide hepatic DNA methylation and determined the responsible gene clusters and genes. Seven-week-old male C57BL/6 mice fed either control diet (CD), calorie-restricted control diet (CRCD), or high-fat diet (HFD) for 16 weeks after one

week acclimation to control diet. Food intake, body weight, and liver weight were measured routinely. Triacylglycerol and cholesterol concentrations were determined using enzymatic colorimetric kits. Genome wide DNA methylation changes were determined by a DNA methylation microarray method with methylated DNA immunoprecipitation. Transcription levels of individual genes were measured by conventional RT-PCR. DNA methylation status of genes in biological networks related to lipid metabolism and hepatic steatosis were influenced by HFD-induced obesity. Compared to control diet, proinflammatory *Casp1* gene had a hypomethylated CpG region at 1.5 kb upstream of its transcription start site (TSS) and showed higher mRNA level in HFD mice. Moreover, in HFD group, energy metabolism-associated *Ndufb9* gene had hypermethylated CpG region at 2.6 kb downstream of TSS and lower mRNA expression compared to CRCD group. In conclusion, HFD alters DNA methylation profiles of the genes associated with liver lipid metabolism and hepatic steatosis. Especially, methylation status of *Casp1* and *Ndufb9* were influenced by HFD along with changes in the expression of these genes, which seemed to be regulated by the methylation status.

Keywords: high-fat diet, DNA methylation, high-throughput study, liver, *Casp1*, *Ndufb9*